

【特許請求の範囲】

- (1) 分子はT細胞活性化を誘導することなく抗体産生を誘発する、分子を用いる治療によりスーパー抗原の毒性作用を防止する方法。
- (2) 分子は突然変異したスーパー抗原である、請求の範囲第1項に記載の方法。
- (3) 分子は修飾したスーパー抗原である、請求の範囲第1項に記載の方法。
- (4) 突然変異したスーパー抗原よりなる分子。
- (5) 修飾したスーパー抗原よりなる分子。
- (6) T細胞リセプター（TCR）の特異的V β 成分と相互作用する分子を投与することよりなる、抗原により誘発されるT細胞応答を修飾する方法。
- (7) 分子は突然変異したスーパー抗原である、請求の範囲第6項に記載の方法。
- (8) 分子は修飾したスーパー抗原である、請求の範囲第6項に記載の方法。
- (9) 分子はT細胞活性化を誘導することなく抗体産生を誘発する、分子を用いる治療によりスーパー抗原の毒性作用を治療する方法。

【発明の詳細な説明】

突然変異したスーパー抗原の保護作用

発明の分野

本発明は、抗原介在性疾患および抗原開始性疾患の防止と治療に関する。具体的には、スーパー抗原の病理作用を持たないスーパー抗原に対する抗体応答を誘発する、修飾されたスーパー抗原または突然変異したスーパー抗原である分子の投与による、スーパー抗原病原体に対する保護を与えることに関する。本発明の分子はまた、T細胞が抗原に応答するような修飾に至る方法でT細胞リセプターのV β 成分と相互作用することもある。

発明の背景

脊椎動物の免疫系は、微生物や大きな寄生体による感染から脊椎動物を保護するように進化した。この免疫系は以下の2つの方法のいずれかにより抗原に応答する：(1) 血中を循環し、それらを誘導した外来の抗原に特異的に結合する蛋白抗原の産生を含む、B細胞介在性の体液性抗体応答。抗原への抗体の結合により、食細胞が抗原を消化し、抗原を破壊するのを助ける血中蛋白系（まとめて補体と呼ばれる）をしばしば活性化する；そして(2) もし抗原が感染性ウイルスの場合は宿主細胞を死滅させることにより、または他の宿主細胞（例えば食細胞）を誘導して抗原を破壊することにより、主に宿主細胞の表面上の外来の抗原と反応する特殊な細胞の産生を含む、T細胞に介在される細胞介在性免疫応答（細胞の分子生物学（Molecular Biology of the Cell）（1983）、アルバーツ（B. Alberts）ら（編）、第17章、952頁）。

抗体の産生には、抗体を産生するB細胞の刺激に至る多くの前段階が起きることが必要である。抗体産生に至る工程に含まれる主要な段階の1つは、抗原認識の段階である。抗原認識には胸腺（T）細胞の参加が必要である。

T細胞はその表面にT細胞抗原リセプター（TCR）と呼ばれる抗原特異的リセプターを有する。T細胞が蛋白抗原を認識することができる前に、抗原は抗原提示細胞の表面に提示されなければならない。抗原はまずマクロファージまたは他の抗原提示細胞により処理されなければならない。これらの細胞は基本的に抗

原を飲み込み、それらをペプチドに切り刻んで、ペプチドは主要組織適合複合体 (MHC) 分子とともに細胞表面に提示する。

主要組織適合抗原は、主要組織適合複合体と呼ばれる遺伝子の複合体によりコードされる抗原のファミリーである。MHC 抗原はすべての高等脊椎動物の細胞の上に発現される。ヒトにおいてはこれらは最初に白血球の上で証明されたため、HLA 抗原 (ヒト白血球関連抗原) と呼ばれる。MHC 分子には2つの主要なクラス (クラス I とクラス II) がありそれぞれ細胞表面糖蛋白のセットよりなる。この2つのクラスのMHC 抗原はT細胞の異なる亜集団を刺激する。MHC クラス II 分子は病原体に対する多くの応答に関与している。これに対してMHC クラス I 分子は、病原体がウイルスまたは悪性腫瘍細胞の場合に関与する。MHC クラス I が関与する時、抗体刺激は起きず、MHC クラス I 処理した抗原とT細胞の相互作用により、病原体に感染した細胞の溶解が起きる。

処理された抗原ペプチドはMHC 分子の裂け目に適合する。抗原が提示されると、その特定のペプチドに対するリセプターを有する体の中の数個のT細胞がその複合体に結合する。多くのT細胞は、同じ細胞表面上の自己MHC 糖蛋白と一緒にする場合のみ細胞の表面上の抗原を認識する。

処理された抗原およびMHC 複合体と複合体を形成するT細胞の能力は、T細胞リセプター (TCR) に依存する。TCRは2つの蛋白鎖 (α と β) よりなる。各鎖は定常ドメインと可変ドメインを有する。可変ドメインは2つ (α) または3つ (β) の異なる遺伝子断片中にコードされている (可変 (V)、多様性 (D)、結合 (J)) (シウ (S i u) ら (1984) C e l l 37:393 ; ヤナギ (Y a n a g i) ら (1985) P r o c. N a t l. A c a d. S c i. U S A 82:3430)。各T細胞において α 鎖と β 鎖のV、DおよびJドメインの組合せが、T細胞にのみ特徴的な方法で抗原認識をし、唯一の結合部位を規定する。マラック (M a r r a c k) ら (1988) I m m u n o l . T o d a y 9:308 ; トヨナガ (T o y o n a g a) ら (1987) A n n. R e v. I m m u n o l. 5:585 ; デービス (D a v i s) (1985) A n n. R e v. I m m u n o l. 4:529 ; ヘンドリック (H e n d r i c k) ら (1982) C e l l 30:141 ; バビット (B a b

b

itt) ら (1985) Nature 317:359; ブース (Buus) ら (1987) Science 235:1353; タウンゼント (Townsend) ら (1986) Cell 44:959; ビョルクマン (Bjorkman) ら (1987) Nature 329:506) を参照。一般的に α 鎖と β 鎖は、処理された抗原とMHCにより形成されるリガンドの認識に関与している。

T細胞が抗原により刺激される時、それらは分裂し、種々の細胞介在性免疫反応に関与する活性化エフェクター細胞に分化する。T細胞により少なくとも3つの反応が行われる：(1) 細胞毒性T細胞は外来性またはウイルス感染した脊椎動物細胞を特異的に死滅させる；ヘルパーT細胞はBリンパ球を助ける；そして(3) サプレッサーT細胞は特異的細胞の応答を抑制する。

最近「スーパー抗原」と呼ばれる新規のクラスの抗原は、特定のV β 成分（すなわちTCRの β 鎖の可変ドメイン）に結合することによりT細胞を直接刺激することができることが証明されている（カプラー (Kappler) ら (1987) Cell 49:263；カプラー (Kappler) ら (1987) Cell 49:273；マクドナルド (MacDonald) ら (1988) Nature 332:40；プレン (Pullen) ら (1988) Nature 335:796；カプラー (Kappler) ら (1988) Nature 332:35；アベ (Abe) ら (1988) J. Immunol. 140:4132；ホワイト (White) ら (1989) Cell 56:27；ジェーンウェイ (Janeway) ら (1989) Immunol. Rev. 107:61；バーコフ (Berkoff) ら (1980) J. Immunol. 139:3189；カプラー (Kappler) ら (1989) Science 244:811)。従来のペプチド抗原の認識と異なり、T細胞リセプターの他の成分（すなわちD β 、J β 、V α 、J α ）はスーパー抗原結合に何の役割も果たしていないようである。スーパー抗原は一般的にT細胞に対して刺激性であるが、刺激されたT細胞上に存在する特定のV β 成分とのみ

相互作用するようである。V β 遺伝子の相対的な数は限定されているため、多くのT細胞は個々の細胞内で特定のV β 成分を有し、従って特定のスーパー抗原

はT細胞群の大部分と相互作用することができる。すなわちV β 集団の頻度に依存して、全T細胞群の5-30%はスーパー抗原により刺激されるが、通常の抗原に対する同様の応答はふつう1000分の1よりはるかに小さい。スーパー抗原はクラスII MHC分子と相互作用するが、これらはペプチドとしてよりもインタクトの蛋白として作用するようである。すなわちこれらは通常のペプチドの結合する溝には結合しないようである。その代わりこれらは結合溝の外壁上のアミノ酸残基と相互作用するようである。既知のスーパー抗原とそれらの配列と構造については表Iに記載されている。

2つの明確なクラスのスーパー抗原が記載されている。最初のものは20年前に注目され、この時フェステンスタイン (Festenstein) は、あるMHCの同じ株間で混合リンパ球反応において著しい反応を見いだした。刺激性の抗原をMHC抗原と区別するために次位 (minor) リンパ球刺激性 (M1) 抗原と呼んだ (フェステンスタイン (Festenstein) Transplant Rev. 15:62)。これらのスーパー抗原は内因性のレトロウイルス遺伝子によりコードされている (パーマー (Palmer) (1991)

Curr. Bio. 1:74)。マウスにおいてこれらの遺伝子が存在すると、応答するT細胞の顕著な欠失が起き、動物のT細胞リセプター群中に大きな穴ができる可能性がある (プレン (Pullen) ら (1988) 前述)。スーパー抗原の第2のセットは、注射の後に種々の病原作用を産生することができる細菌蛋白またはウイルス蛋白について増え続けるリストにより示される (マラックとカプラー (Marrack & Kappler) Science 248:705)。

普通に見られるヒトの病原体である黄色ブドウ球菌 (Staphylococcus aureus (S. aureus)) は、SEA (スタフィロコッカスエンテロトキシンA) からSEEまで命名されているいくつかのエンテロトキシン (enterotoxin) を産生し、これらはヒトの食中毒や時にショックに

関与している（マラックとカプラー（Marrack & Kappler）（1990） 前述；ボハッチ（Bohach）ら（1990） Crit. Rev. Microbio. 117:251）。いくつかの*S. aureus*単

離株はまた、ヒトの大多数の毒性ショック症候群に関与していると考えられている毒性ショック症候群トキシン-1（TSST-1）や、皮膚剥離症候群（scalded skin syndrome）に関連する関連剥離性トキシン（exfoliative toxins）（ExTF）を産生する。別の一般的なヒトの皮膚や咽頭の病原体であるストレプトコッカスピロゲネス（*Streptococcus pyrogenes*）（すなわちA群ストレプトコッカス）もまた、スーパー抗原性を有するトキシンを産生する（アベ（Abe）ら（1991） J. Immun. 146:3747）。これらはストレプトコッカスエリスロゲニックトキシン（*Streptococcal erythrogenic toxins*）A-C（SPEA-C）と命名されている。

S. aureus トキシンのアミノ酸配列はいくつかの相同性を示すが、また顕著な差異も示す（ベントレー（Bentley）ら（1988） J. Bacteriol. 170:34；ジョーンズ（Jones）ら（1986） J. Bacteriol. 166:29；リー（Lee）ら（1988） J. Bacteriol. 170:2954；ブロムスター-ハウタマア（Blomster-Hautamaa）ら（1986） J. Biol. Chem. 261:15783）を参照）。*S. aureus* はMHCクラスII型分子を有するマウスの細胞の存在下で強力なT細胞の増殖応答を刺激する抗体を有する（カールソン（Carlson）ら（1988） J. Immunol. 140:2848；ホワイト（White）ら（1989） Cell 56:27）。*S. aureus* 蛋白は、特定のV β 成分を有する齧歯類の細胞を選択的に刺激する。

クラスII MHC分子へのトキシンの結合はT細胞認識に必須であるが、この工程は通常の抗原で見られるよりも許容性が高い。ペプチド抗原は結合に際してアレレ（対立遺伝子）性MHC残基に依存性が高いが、スーパー抗原は広範囲のア

レレ性およびイソタイプ型のMHCクラスII分子に結合する (ハーマン (Hermann) ら (1989) Euro. J. Immunol. 19:2171 ;ハーマン (Hermann) ら (1990) J. Exp. Med. 172:709 ;シヨール (Scholl) ら (1990) , J. Immunol.

144:226 ;モレック (Molleck) ら (1991) J. Immunol. 146:463を参照)。T細胞はめったに自己MHC (アロMHC (allo-MHC)) 分子に結合したペプチド抗原を認識しないが、個々のT細胞は、種々のアレル型のMHCのみでなく異なるクラスIIイソタイプや異種間 (xenogenic) クラスII分子にさえ結合したトキシンに応答することができる。そのような観察事実、スーパー抗原は、従来のペプチド抗原が結合すると考えられているアレルとして超可変性の溝より外で比較的保存された部位で結合することを示唆している。

スーパー抗原は自己免疫疾患に関係することもあり、ここでは免疫系の成分が正常な組織を攻撃する。自己に応答するT細胞 (有害な可能性のある自己反応性T細胞) の欠失の工程は寛容または陰性選択と呼ばれる (カプラー (Kappler) ら (1987) Cell 49:273 ;カプラー (Kappler) ら (1988) Nature 332:35 ;マクドナルド (MacDonald) ら (1988) Nature 332:40 ;フィンケル (Finkel) ら (1989) Cell 58:1047)。免疫系は通常自己反応性T細胞は欠失するが、時にこの監視機構を免れるものがいくつかある。ヒトのT細胞群の20%を刺激するスーパー抗原の能力は、自己を認識する循環する数個のT細胞の好ましくない複製につながることを示唆されている (ジョンソン (Johnson) ら (1992) Scientific American 266:92)。ある種のV β 型を有するT細胞は、関節炎や多発性硬化症などの種々の自己免疫症状への関与が示唆されている。これらの知見は破壊性の細胞は、同定されたV β 型に結合するスーパー抗原により活性化されることを意味する (ジョンソン (Johnson) ら (1992) 前述)。

自己免疫疾患は免疫系が自己を認識できないことの結果である。免疫系による

宿主細胞の攻撃により以下のような多数の疾患が起きる：多発性硬化症や重症筋無力症のような神経疾患、リウマチ様関節炎のような関節の疾患、全身性エリテマトーデスで観察されるような核酸への攻撃、種々の臓器に関連する他の疾患（例えば乾癬、若年生糖尿病、シェーグレン症候群、および甲状腺疾患）。これらの疾患は種々の症状を有し、軽いものから生命をおびやかすものまでである。例

えばリウマチ様関節炎（RA）は慢性で再発性の炎症性疾患であり主に関節が関与しており、北アメリカの人口の1-3%に影響を与え、女性対男性の比は3：1である。重症のRA患者は、血管炎、筋萎縮症、皮下結節、リンパ腫、脾腫、および白血球減少症などの関節外の症状を示す。RA患者の約15%は完全に運動痺麻を起こすと推定されている。

自己抗原に特異的なT細胞が自己免疫疾患の開始に決定的な役割を果たすことが、いくつかの証拠により示唆されている。RAの場合は、MHCクラスIIの遺伝子のDR4とDR1アレルとのつながり、そして時に関節液や影響を受けた関節の組織中の小数クローン性の活性化CD4⁺T細胞（スタストニー（Stastny）ら（1976） *Engl. J. Med.* 298：869；ギボフスキー（Gibofsky）ら（1978） *J. Exp. Med.* 148：1728；マクミシェル（McMichael）ら（1977） *Arth. Rheum.* 20：1037；シッフ（Schiff）ら（1982） *Ann. Rheum. Dis.* 41：403；ヅグエストイ（Dugestoy）ら（1984） *Hum. Immunol.* 10：165；レグランド（Legrand）ら（1984） *Am. J. Hum. Genet.* 36：690；グレゲルス（Gregerse）ら（1987） *Arth. Rheum.* 32：15；バーメスター（Burmester）ら（1981） *Arth. Rheum.* 24：1370；フォックス（Fox）ら（1982） *J. Immunol.* 128：351；ヘムラー（Hemler）ら（1986） *J. Clin. Invest.* 78：696；スタメンコイック（Stamenkoic）ら（1988） *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85：1179）の知見は、この疾患へのCD4⁺、 $\alpha\beta$ TCRを有するクラスII

限定性T細胞の関与を示唆している。この見解は種々の方法によりT細胞の部分的除去または阻害をすると、ある患者では疾患が緩和されるという知見により支持される（パウルス（Paulus）ら（1977） Arth. Rheum.

20:1249；カーシュ（Karsch）ら（1979） Arth. Rheum. 22:1055；コチン（Kotzin）ら（1989） N. Eng. J. Med. 305:976；ヘルツォーク（Herzog）ら（198

7） Lancet ii:1461；ヨーカム（Yocum）ら（1989） Ann. Int. Med. 109:863）。

米国特許出願第07/732, 114号（参考のためここに具体的に引用されている）は、自己免疫疾患の診断のために特異的V β 成分が使用できること、具体的にはRAを診断するのに関節液中の高い割合のV β 14⁺T細胞の存在が使用できることを示している。

自己免疫疾患の治療法の開発に焦点をあてた多くの研究がなされている。例えばヨーロッパ特許公報第340, 109号（標題：自己免疫疾患治療として抗T細胞リセプター決定基）、および1985年10月29日出願の米国特許第4, 550, 086号（ラインハルツ（Reinherz）ら（標題：ヒトT細胞を認識するモノクローナル抗体）は、特定の疾患に関連したT細胞リセプターの可変領域遺伝子の特定の配列の検出法と、その配列に対する抗体による疾患の治療法を記載している。1989年12月12日出願の米国特許第4, 886, 743号（フッド（Hood）ら）（標題：T細胞リセプターの可変領域内の唯一の配列に基づく診断試薬とその利用）は、特定の疾患に関連するV β 領域中の唯一の配列を有するT細胞の存在に基づく疾患の診断方法を記載している。PCT特許出願公報第W090/06758号は、RAに関連した特異的なV β 領域（具体的にはV β 3、V β 9およびV β 10）を検出する方法と、V β 3、V β 9およびV β 10を認識するモノクローナル抗体によるRAの治療法を記載している。

免疫

病原体に暴露されたことのない動物は、それに対して特異的な防御を有してい

ない。しかし病原体と化学構造が類似であるが病原作用を示す能力のない非病原型の病原体を注射することにより、動物を病原体に対して免疫することができる。動物は病原体の非病原型に対して特異的な抗体を産生し、これらの抗体は動物を病原型の病原体から防御する。

発明の要約

本発明は分子を用いる治療によるスーパー抗原の毒性作用を防止する方法を包含し、ここで該分子はT細胞活性化をすることなく抗体産生を誘発する。

本発明はまた、スーパー抗原の修飾された誘導体または突然変異した誘導体よりなる分子を包含する。

本発明はさらに、T細胞リセプター(TCR)のV β 成分のみまたは α 鎖および β 鎖の両方と相互作用する分子を投与することよりなる、抗原により誘発されるT細胞応答を修飾する方法を包含する。

本発明の分子は、特定のV β 成分を提供するT細胞の少なくとも1つまたはそれ以上の亜集団の欠失または不活性化/脱感作に導くことにより機能する。

スーパー抗原の毒性作用を防止するには、この作用の達成方法を正確に理解する必要がある。本発明より以前に、スーパー抗原がどのようにしてT細胞と相互作用するかは公知であったが、対象動物が病状を示す機作と病状は進展するののか否かについては十分理解されてこなかった。種々の観察事実は、いくつかの機構のうちのどれかが毒性の原因であることを示唆している。

スーパー抗原に介在されるかまたは開始される病状は、本発明の突然変異体スーパー抗原分子の投与により、防止されるかまたは治療されることが見いだされた。本発明の突然変異トキシンの投与により、突然変異分子に対する抗体産生を引き起こすことがある。これらの抗体のいくつかはまた、正常の非突然変異トキシンと反応する。従って免疫された個人が通常のトキシンに直面する時、これらの交差反応性抗体は通常のトキシンと反応しそのトキシン活性を阻害する。

図面の簡単な説明

図1はSEBの3次元構造のリボン模式図である。領域1(残基9-23)、領域2(残基40-53)、および領域3(残基60-61)は影をつけて区別

されている。MHCまたはTCR結合に関与する部位が示してある。MHCおよび／またはTCR結合に重要な突然変異解析により同定される残基が示してある。

図2aは大腸菌から精製された2 μ gの組換えSEBと*S. aureus*培養物から精製された野生型SEBのSDS-PAGE解析を示す。分子量マーカー(kD)： β -ホスホリラーゼ、94；ウシアルブミン、69；オバルブミン、45；カルボキシラーゼ、30；大豆トリプシンインヒビター、21；リゾチーム、14。図2bはLG2細胞上のDRへのSEB結合のSDS-PAGE解析

を示す。分子量マーカー(kD)：ウシアルブミン、69；オバルブミン、45；キモトリプシノーゲン、27；大豆トリプシンインヒビター、21；ミオグロビン、17；リゾチーム、14。

図3はSEB突然変異体の配列を示す。破線はSEBの突然変異していない部分を示す。SEB突然変異体を作成するのに使用したオリゴヌクレオチドの位置も示してある。

図4はDR-1を有するリンパ芽腫株T-G2細胞へのSEBとSEB突然変異体の結合を示す。

図5は領域1 SEB突然変異体によるT細胞ハイブリドーマの刺激を示す。精製したSEBまたは領域1突然変異体の調製物を、SEBを認識することが公知のV β 成分を有するT細胞ハイブリドーマの集団を刺激する能力について試験した：KS-20.15 (V β 7)、KS-6.1 (V β 8.2)、KS-47.1 (V β 8.3)、K16-57 (V β 8.1)。

図6は領域2 SEB突然変異体によるT細胞ハイブリドーマの刺激を示す。精製したSEBの調製物を図5のように試験した。

図7は領域3 SEB突然変異体によるT細胞ハイブリドーマの刺激を示す。精製したSEBの調製物を図5のように試験した。

図8はSEBとその突然変異体のインビボでの作用を示す。3匹の群のマウスの重量を測定し、次に0、50 μ g (左)または100 μ g (右)の組換えSEBまたは突然変異体SEB BR-257またはSEB BR-358を含有す

るバランスト塩溶液（BSS）を与えた。

図9はSEB抗原投与に対する突然変異体トキシンの防御効果を示す。マウスに野生型のSEB抗原投与の3カ月前に生理食塩水またはBR-257を投与した。

発明の詳細な説明

本発明の分子は、抗原介在性疾患および抗原開始性疾患を異なる方法で防止または治療するのに有効である。本発明の分子が有効である異なる方法には、病原体に対して防御を与えるT細胞応答の修飾と抗体の産生がある。具体的には本発明は、スーパー抗原介在性疾患およびスーパー抗原開始性疾患の防止または治療

法を与える。本発明の方法は一般的に、当該分野で公知であり本発明中に記載されている方法により、突然変異したスーパー抗原分子を調製し、MHCまたはTCRに結合することができる抗原突然変異体を同定し、そして突然変異していないスーパー抗原への暴露に対して防御能を与えることができるか否かを試験することよりなる。

本発明は既知のスーパー抗原に対する防御を達成するための前述の方法の実現可能性を記載する。組換えスタフィロコッカスエンテロトキシンB（SEB）の突然変異体を調製し、以下の実施例1-4に記載のように精製した。HLA-DR1ホモ接合リンパ芽種株LG2細胞への突然変異体SEB分子の結合と異なるVβ成分を有するT細胞ハイブリドーマの刺激を調べて、MHC分子またはTCRに結合することができるSEB突然変異体を選択した。突然変異していないSEBと区別できない程度にLG2細胞に結合しT細胞ハイブリドーマを刺激しなかったSEB突然変異体BR-257を、SEBに暴露する3カ月前に実験動物に注射すると、SEBの毒性作用に対して完全な防御を示した。霊長類でも同様の結果が得られた。

本発明の開示内容はSEBの以後の抗原投与に対して動物を防御することができる、突然変異したSEB分子の産生を記載しているが、本発明の方法は他のスーパー抗原にも同様に適用可能である。

スーパー抗原が介在する自己免疫疾患の検出法や治療法として、先に詳述した

自己免疫疾患の診断に特異的V β 成分の存在を利用することができる能力を本発明とともに組合せることができる。スーパー抗原の介在する疾患の存在は、「指紋」解析（例えば疾患状態でV β 成分に変化があるか否か）により、測定することができる。V β 成分中の変化（リウマチ様関節炎の関節液中のV β 1 4⁺T細胞の増加）は、スーパー抗原介在疾患の存在を示唆している。次に示唆されるスーパー抗原を同定するのに、当該分野で公知の方法を適用することができる。疾患の開始または進展にスーパー抗原の関与の可能性があるか否かについて、V β 指紋を公知のスーパー抗原のそれと比較することができる。ウイルス感染または細菌感染が疾患の開始に関連している時は、スーパー抗原をコードする遺伝子を探索してもよい。スーパー抗原が同定または単離されれば、スーパー抗原の暴露

に対して防御を与えることができる突然変異スーパー抗原分子を産生するのに、本発明の方法が適用される。

本明細書において種々の用語が使用され、それらについて定義することが有用であろう。以下にそれらを示すが、これらは以下の実施例で使用されていることを注目すべきである。

前述したように免疫応答における主要な過程は、MHC分子が抗原と相互作用してT細胞に提示される複合体を形成することである。一般にT細胞応答は非常に特異的であり、抗原とMHC分子の特定の複合体に対して応答するT細胞の亜集団は非常に限定される。この応答は一般にT細胞リセプターのほとんどまたはすべての成分の相互作用を必要とする。しかしながらある場合においては、提示された抗原はリセプターのV β 成分とのみ相互作用すればよく、他のすべての成分は基本的に関係がない。これは抗原は、通常の場合よりも多くのT細胞と反応することができる、かつしていることを意味している。

本発明の分子は、T細胞がスーパー抗原に応答するような修飾に至るように、T細胞リセプターのV β 成分と相互作用することができる。「T細胞応答性を修飾する」ことは、対象のT細胞が投与された分子により刺激された時、または同時、前または後に投与された抗原に対して応答する方法を変化させることができることを意味する。例えばT細胞の成長の初期にある亜集団は提示された抗原に

相互作用し欠失される。本発明の分子はこうして（すなわち特定のV β 成分を提示するT細胞の少なくとも1つまたはそれ以上の亜集団の欠失または不活性化／脱感作に導くことにより）作用する。

本発明の特定の実施態様において、分子は、検討の対象に通常起きるB細胞応答を変化させることなく、T細胞応答を修飾する。このタイプの物質は、例えば対象に受動免疫を与えることにより、またはワクチンとして作用することにより、有用である。スーパー抗原誘導体を使用する時、これらは制限されたT細胞応答を引き起こさず、B細胞応答を引き起こすように抗原として作用するため、これらの誘導体はもうスーパー抗原性は有しない。本発明のスーパー抗原誘導体はスーパー抗原蛋白に対して通常の抗体産生を誘発することができる。

本発明の抗原はまた、他の抗原の競合物質として見ることができる。ここに記載する分子が、他の場合には抗原またはスーパー抗原に対する全面的な応答を産生するのに必要なMHC成分と相互作用するなら、これらはその応答の程度を防止または低下させるであろう。

本発明の分子はまたある場合には「エンハンサー」として見ることができ、この場合個々のT細胞応答はいくつかの理由により障害されるか、または減弱される。本発明の包含する分子の投与により、個々のT細胞集団は大幅に拡大される。

本明細書で「T細胞応答性を修飾する」という用語は、いつも第2の成分（例えば抗原）に対するものであり、特にいつもT細胞リセプターの一部として特定のV β 成分を提示するT細胞の応答に対するものであり、リセプターの他の成分は基本的に関係がない。

本発明の分子は、少なくともMHC分子に結合するのに十分なサイズのアミノ酸配列を含有する。残りの分子はアミノ酸、または炭水化物または脂質構造よりなっているもよい。

「応答性を低下させる」という用語は、特定のV β 成分を発現するT細胞の部分に欠失させることも意味する。

本明細書で使用する「スーパー抗原誘導体」とは、少なくともその構造がMH

CまたはT細胞に結合するのに必要なスーパー抗原またはスーパー抗原の一部により提示されるアミノ酸配列と実質的に同じアミノ酸配列を含有する分子を意味する。

「修飾された」スーパー抗原誘導体（または断片）は、「突然変異した」スーパー抗原（または断片）とは異なる。「修飾されたスーパー抗原」という用語は、スーパー抗原のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を含有するが、スーパー抗原分子自身には見られない修飾を含有する分子を意味すると定義される。例えばスーパー抗原がアミノ酸1-250を含有するなら、「修飾された」スーパー抗原誘導体は、本来のスーパー抗原分子中には見られないアミノ酸配列が広がった部分に位置する、アミノ酸50-75と同じ配列を含有する。追加の修飾は例えば、異なるグリコシル化またはグリコシル化の欠如、または通常は何もないところのグリコシル化がある。

「突然変異した」スーパー抗原とは、分子の本来の形に比較して突然変異の実際のアミノ酸配列が変化している構造を意味する。例えばスーパー抗原がアミノ酸1-250を含有する場合、突然変異したスーパー抗原は、対応する本来の配列と同じであるがアミノ酸69-71で異なる、アミノ酸50-68と72-75を含有する。この差は、異なるアミノ酸が使用される「置換」、アミノ酸が追加されて本来の形より長い「付加」、またはアミノ酸が欠失している「欠損」のうちの1つである。

「ワクチン」とは、対象に投与された時ワクチン一般に典型的な同じタイプの応答（例えば免疫予防）を引き起こす製剤を意味する。ワクチンはアジュバントまたは他の物質を含有してもよい。

スーパー抗原として知られている分子のクラスはT細胞リセプターの特定のV β 成分と相互作用し、特定のT細胞亜集団が大量に増加することは公知である。MHC分子とスーパー抗原の前の相互作用を仮定しているこの相互作用は、T細胞リセプターの他の領域とは完全に独立している。

MHCとペプチドの相互作用に関連して、MHC分子は種々の「表現型」として入手でき、異なる表現型は種々の提示されたペプチドや抗原に対して特異的で

あることに注意すべきである。例えばHLA-DRはSEBの提示に関連していることは公知である。すなわち異なるMHC表現型は異なる抗原にとって価値があるが、HLA表現型の測定と特定の抗原または抗原ファミリーの提示との相関の測定は十分に当業者の技術範囲内にある。

すなわち本発明は、MHC分子とT細胞リセプターの少なくとも1つのV β 成分の両方に相互作用する分子の対象への投与を介する、T細胞応答の修飾を含む。この相互作用はいくつかの方法でT細胞応答に影響する。応答に影響するおそらく最も初歩的な方法は、分子がMHC分子と相互作用し、他の分子のMHCへの結合を妨害することである。通常の抗原またはスーパー抗原はT細胞増殖性応答を引き起こす複合体をMHCと形成することができないため、競合する分子が修飾されるかまたはT細胞の増殖を誘導しない場合、応答の減弱または排除があるであろう。

T細胞応答を修飾する他の方法は、T細胞を「脱感作」、「不活性化」または

「アネルギー化」（免疫力低下）することである。この機構は、MHC分子、抗原およびT細胞リセプターとの相互作用、以下のダウンレギュレーション（down regulation）またはT細胞の不活性化を含む。この機構は成熟した対象では、胎児で発生する欠失現象より一般的である。後者の現象は、3つの単位の相互作用を介してT細胞の種々の亜集団が実際に生物から除去される1つである。

T細胞応答の修飾はまた、T細胞亜集団の刺激を含む。本明細書で記載される情報は、当業者がMHCと相互作用する物質およびT細胞の特定の亜集団を対象に投与して、T細胞の亜集団を増殖させることを可能にする。この方法は、特定のV β 亜集団が病状（例えば自己免疫疾患）に関連している場合、疾患の治療に特に好ましい。

免疫応答とはよく考えるとB細胞とT細胞の応答の両方を含むことを理解すべきである。本発明の1つの面は、B細胞応答を修飾することなくT細胞応答を修飾する分子の使用である。そのような物質は、後述するように特にワクチンとして有用である。

本発明の分子は、好ましくは（しかしこれに限定されない）スーパー抗原誘導体である。これらの誘導体は前述したように修飾または突然変異されてもよい。これらの分子または本明細書に記載の他の分子は、記載される方法でT細胞応答を修飾するのに十分な量で投与される。使用される物質の量は、実際の物質、必要な応答および治療の対象により異なる。

該分子はまたワクチンとしても作用する。これらのワクチンは、分子の普通の型に通常関連する全T細胞応答なしで、B細胞応答を産生するという意味で、対象に防御免疫を与える。実施例7は、SEBの効果の1つを示す。再び、当業者の知識の調節範囲内の変数（治療すべき症状、調節されるV β 分子など）に依存して、ワクチンとして選択される物質は当業者の責任である。このワクチンは、ワクチン組成物として通常見られる他の物質（アジュバント、担体など）を含有していてもよい。

本明細書に記載の物質の投与方法（静脈注射、腹腔内注射および筋肉内注射）は、対象への治療薬の投与の他の標準的方法のすべてと同様に異なる。

本発明はまた、前述の方法に有用な特定の突然変異体を作成する方法を開示する（例えば突然変異体をコードする単離された核酸配列、これらやこのために使用されるベクターおよびプラスミッドにより形質転換される細胞株、及び単離された突然変異体分子（突然変異スーパー抗原を含む）を含む）。

本明細書中に記載される本発明の他の応用は当業者に明らかであり、ここで繰り返す必要はないであろう。

使用される用語や表現は、記述のためであり決して限定するものでなく、そのような用語や表現を用いる場合に示され記載される特徴と同等のものおよびその一部を決して排除するものではなく、本発明の範囲内において種々の修飾が可能であることは理解すべきである。

ポリメラーゼチェーン反応（PCR）や標準的分子生物学的方法（実施例1に記載）は、組換えSEBの作成と発現に使用された。そのような突然変異体は、実施例2に記載の2つの方法のうちの1つにより作成された。最初の方法はSEB遺伝子の全長にわたってランダムな突然変異を導入した。第2の方法はSEB

遺伝子の約60-75塩基に規定される領域中にランダムな突然変異を導入した。突然変異SEBの可能性のあるものの最初の同定では、ヒトDR-発現細胞株中の異なるV β 成分を有する齧歯類のT細胞ハイブリドーマの刺激により、機能するトキシンの存在につき形質転換体からの溶解液を試験した。T細胞ハイブリドーマの刺激で陰性の溶解液は、SEBに対するモノクローナル抗体(mAbs)の使用によりSEBの存在を試験した(実施例3)。非機能性のSEBを産生する形質転換体の配列を決定し、突然変異体を同定した。突然変異SEBを産生する形質転換体を増殖させ、実施例4に記載するように突然変異SEBを精製した。突然変異の位置と作用の解析を行った。T細胞によるトキシン認識にMHCクラスII分子への結合が必須であるため、実施例5に記載するようにヒトMHC抗原HLA-DR1に結合する突然変異SEBの能力を試験した。突然変異していないトキシンにより刺激される特異的V β 成分を有するハイブリドーマのあるもの(すべてではない)を選択的に刺激する突然変異SEB(例えば領域3突然変異体)を産生させた。すなわち野生型のスーパー抗原により刺激されるT細胞集団のほんの一部を選択的に刺激するのに、本発明の突然変異したスーパー抗原を使用することができる。

SEBのN-末端部にMHCおよび/またはTCR結合に影響する3つの領域が同定された(実施例4と図1)。領域1(残基9-23)の突然変異はMHCとTCR結合の両方に影響を与えた。この結果は23Nが特に重要であることを示唆していた。S. aureusエンテロトキシンが最大の相同性を有するように配向する時(マラックとカプル(Marrack & Kappler)(1990)、前述)、この残基はすべてのエンテロトキシンと毒性ショックトキシン中で保存される。領域2(残基41-53)中の突然変異は、T細胞を刺激することができる同様の効果を持って、トキシンがMHCクラスIIに結合する能力を劇的に減少させた。突然変異の約半分にF44が関与していた。再び、すべてのエンテロトキシンでこの残基は保存され、この残基はすべてのトキシンのMHCへの結合に非常に重要な役割を果たすことを示している。興味深いことに領域1または2のいずれかの突然変異のどれもMHCへのトキシンの結合を抹消するも

のはなく、いずれの場合も突然変異体のT細胞刺激能力は、大量の過剰のトキシンを加えることにより回復された。領域3での突然変異(60N、61Y)はトキシンのMHCへの結合に影響しなかったが、2つのV β (7と8.1)との相互作用に影響を与えた。このV β 特異的作用は、これらのアミノ酸はいくつかのTCRV β (おそらく他のV β 成分ではない)との相互作用に重要であることを示唆している。

動物における突然変異SEBの毒性は、実施例6に記載のように試験した。マウスにバランスト塩溶液(BSS)、組換えSEB、またはF44(BR-358)またはN23(BR-257)での領域I SEB突然変異体を注射した。いずれかの突然変異SEBの50 μ gを与えたマウスは、BSSを与えたマウスと区別することができなかったが、組換えSEBを与えたマウスは5日以内に死んでしまった。

SEBから免疫防御能を与える突然変異SEBの能力をインビボで試験した(実施例7)。SEBで抗原投与する3カ月前に100 μ gの突然変異SEB BR-257を与えたマウスは、SEBの毒性作用から完全に防御されたが、BR-257を与えなかったマウスはSEBによる抗原投与の4-5日後に死んだ。

霊長類でも同様の結果が得られた。サルにおける嘔吐応答を誘発するのに突然変異SEB BR-358またはBR-257は、効果がないか効果があっても小さかった(実施例7)。

実施例8はSEAトキシンへの上記方法の応用と、対応するSEB突然変異体と同じ挙動をするSEA突然変異体の産生を記載している。

実施例1. 組換えSEBの作成と発現

ポリメラーゼチェーン反応(PCR)

PCR(サイキ(Saiki)ら(1988) Science 239:487)は、アンプリタク(AmpliTaq)組換えTaqポリメラーゼとパーキンエルマーシータス(Perkin Elmer Cetus)(ノーウォーク(Norwalk)、コネチカット州)のDNAサーマルサイクラーを用いて行った。1分間の変性工程とアニーリング工程、<500bp合成のための1分

間の延長工程と $>500\text{ bp}$ 合成のための2分間の延長工程を20-30サイクル行った。テンプレート濃度は $1-10\text{ M}$ であり、オリゴヌクレオチドプライマー濃度は $1\text{ }\mu\text{ M}$ であった。dNTPの濃度は $200\text{ }\mu\text{ M}$ であるが、突然変異を導入する場合は1つのdNTPの濃度を 20 mM に低下させた。

SEB作成体

以下のようにスーパー抗原SEBの遺伝子を過剰発現させた。シグナルペプチドを含まず成熟SEBをコードする遺伝子の部分に隣接する (f l a n k) オリゴヌクレオチドプライマーを用いてPCRにおいて、SEB遺伝子を含有する線状化プラスミッド (ラネリ (R a n e l l i) ら (1985) P r o c. N a t l. A c a d. S c i. U S A 82:5850) をテンプレートとして用いた。5' プライマー (配列番号1)

5'-TAGGGAATTCCATGGAGAGTCAACCAGA-3'

である。

このプライマーは、プラスミッドpTZ18R (ファルマシアファインケミカルズ (P h a r m a c a F i n e C h e m i c a l s)、ピスカタウェイ (P i s c a t a w a y)、ニュージャージー州) 中にクローン化された時L a c Z遺伝子のフレーム内にSEB遺伝子を入れるE c o R I部位を含有する。この

オリゴヌクレオチドプライマーはまた、SEB遺伝子が、それ自身の開始ATGを有する他のプライマーに容易に移動できるように、L a c Z遺伝子断片とSEB遺伝子の最初の間(ATGを加えるN c o I部位)を含有する。この3' プライマーはSEB遺伝子の停止コードの後ろにH i n d III位を含有していた (配列番号2) :

5'-AGCTAAGCTTCACTTTTTCTTTGTCG-3'

このPCR断片をE c o R IとH i n d IIIで消化し、E c o R I/H i n d I I I消化pTZ18Rに結合させた。大腸菌XL1-ブルー (ストラタジェン (S t r a t a g e n)、ラホイヤ (L a J o l l a)、カリフォルニア州) をこのプラスミッドで形質転換し、単一の形質転換体を採取し、挿入体 (pSEB2) の配列を決定して突然変異が無いことを確認した。

誘導により pSEB2 作成体はほとんど細胞質性の SEB の過剰産生を引き起こした (約 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ブロス)。しかし LacZ/SEB 融合蛋白を産生するよりも、この細菌は *S. aureus* から分泌された SEB と同じ見かけの分子量を有する蛋白を産生した (図 1a)。この融合蛋白の LacZ 部分は大多数の SEB からインビボで切断されたか、または LacZ と SEB の間に導入された ATG は LacZ の翻訳開始部位より効率的であった。

実施例 2 SEB 突然変異体の産生

SEB 突然変異体を 2 つの方法のうちのいずれかにより産生させた。1 つの方法では SEB 遺伝子の全長にわたってランダム突然変異が導入された。このために実施例 1 の SEB 作成体を調製したが、PCR は Taq ポリメラーゼのエラー率を増加させるために dATP または dTTP 濃度を 10 倍減少させて行った (イニス (Innis) ら (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:9436)。これにより生成物量は 5-10 倍減少する。2 つの反応の生成物を一緒にし、実施例 1 に記載のように pTZ18R にクローン化し、実施例 3 で BR 突然変異体で記載したように、個々の形質転換体を突然変異 SEB についてスクリーニングした。スクリーニングした約 400 個のトキシン産生形質転換体のうち、10 個は T 細胞を刺激する能力により機能性突然変異体として同定した。低濃度の dCTP と dGTP を同様に処理したが、生成物の結果において低下の程度はより少なく、約 200 個の形質転換体をスクリーニングしても突然変異体は検出されなかった。

SEB 遺伝子の約 60-75 の塩基で規定される領域にランダム突然変異を導入するのに第 2 の PCR 法を用いた。各位置がそれぞれ 1% のずつの 3 つの正しくない塩基を含有する、図 2 に示すように位置した以下のオリゴヌクレオチドプライマー (A (配列番号 3)、B (配列番号 4)、そして C (配列番号 5)) を合成した:

A-: 5'ATTCCCTAACTTAGTGTCCTTAATAGAAATATATTAAGTCAAAGTATAG
AAATTGATCTATAGA3'

B-: 5'AGCTAGATCTTTGTTTAAATTCGACTCGAACATTATCATAATTCCC
GAGCTTA3'

C+: 5'CCGGATCCTAAACCAGATGAGCTCCACAAATCTTCCAATTCACAGGCC
TGATGGAAAATATGAAAGTTTGTAT3'

これらの突然変異オリゴヌクレオチドは、ベクター（AとB）または内部SEB（C）オリゴヌクレオチドを池のプライマーとして、そしてSEB遺伝子をテンプレートとするPCR反応のプライマーとして作用した。合成したSEB断片の各分子は、突然変異プライマーに対応する領域に2-3個のランダム塩基突然変異を有することが予測された。突然変異断片をPCR反応中の混合テンプレートとして単独でまたは遺伝子の3'部を含有する他の断片とともに、SEB遺伝子に取り込んで、全長SEB2遺伝子を再合成した（ホー（Ho）ら（1989）Gene 77:51; プレン（Pullen）ら（1990）Cell 61:1365）。あるいは適当な制限酵素で消化し、pSEB2に結合し、ここから対応する領域を取り出すことにより、これを行った。

DNA配列決定

プラスミッド挿入体を、セクアナーゼ（Sequenase）（ユーエスバيوケミカル社（U. S. Biochemical Corp.）、クリーブランド、オハイオ州）を用いるサンガー（Sanger）ら（1977）（Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463）の方法により、2本鎖スーパーコイルプラスミッドテンプレートに対する修飾を用いて配列決定した

（ウェイカートとチャブリス（Weickert and Chambliss）（1989）Editorial Comments、U. S. Biochemical Corp.）、クリーブランド、オハイオ州、5-6頁）。

実施例3 SEB突然変異体の形質転換体のスクリーニング

抗SEBモノクローナル抗体（mAbs）

SEBで複数回免疫したB10.Q（ β BR）から標準的方法により、少なくとも5つのSEBのエピトープに特異的な10個のモノクローナル抗体を産生し

た。これらの抗体の1つ(B344.1)を、SEBとSEB突然変異体の定量と免疫親和性精製の両方に用いた。B344.1はIgG1であり、SEBに対して高親和性を有し、MHCクラスII分子に結合したSEBを検出し免疫沈降させ、DRに結合したSEBをT細胞認識を妨害しなかったため選択された(データは示していない)。

SEBの酵素結合免疫吸着測定法

調製物中のSEBの量はELISA(酵素結合免疫吸着測定法)により測定した。6 μ g/mlの天然のSEB(シグマケミカル社(Sigma Chemical Co.))、セントルイス、ミズーリ州)の溶液で、マイクロタイタープレート(ウエル)を一晩被覆した。次にウエルを25%FCSでインキュベートし、完全に洗浄した。種々の濃度の既知および未知のSEB調製物をインヒビターとしてウエルに加え、次に一定量の抗SEB抗体(トキシンテクノロジー(Toxin Technology)、マジソン(Madison)、ウイスコンシン州)(BR実験中のポリクローナルウサギ抗SEBとBA、BBおよびBC実験中のモノクローナル抗SEB、B344)を加えた。1時間後ウエルを完全に洗浄し、ヤギ抗ウサギIgGに結合したアルカリ性ホスファターゼ(シグマケミカル社(Sigma Chemical Co.))または基質としてp-ニトロフェニルホスフェートを用いる標準的方法により、結合した抗体を検出した。データのコンピューター解析により、405nmでの反応のODをインヒビターの投与量と未知物質中のSEBの濃度に関連させた。

突然変異SEBの可能性のあるものの最初のスクリーニング

最初のスクリーニングのために、突然変異SEB遺伝子の可能性のあるものを含有する個々の形質転換体から、記載されるように完全な溶解液を調製した。ヒトDR-発現細胞株を提示細胞として用いて、 α/β リセプターを持っている齧歯類のT細胞ハイブリドーマをV β 7またはV β 8.3で刺激して、機能性トキシンの存在について試験した。産生されたSEBのレベルまたは全長に影響を与える突然変異の可能性を排除するために、これらのハイブリドーマのいずれかを刺激することが欠損している溶解液を、SEB蛋白の存在について測定した。突

然変異を見つけるためにそれらから蛋白を産生するプラスミッドの配列決定を行った。突然変異体の配列を図2に示す。

Taqポリメラーゼでエラーを誘導したランダム突然変異体(BR)を3つの領域(1, 2, 4)で、すべて分子のアミノ末端の93アミノ酸で集めた(ただし、分子のカルボキシル基末端での1つのケース、BR-374での追加の保存性突然変異を除く)。その産生法から予測されるように1つを除くこれらすべての突然変異はAからGまたはTからCの突然変異であるが、これらの配列の別のところに1つのサイレント突然変異(silent mutation)が見られた。突然変異オリゴヌクレオチドCまたはA(BC、BA突然変異体)とともに領域1または2に追加の突然変異体が産生された。領域3は、もともとオリゴヌクレオチドAによりカバーされる最後のアミノ酸を含む単一の突然変異体(BA-62)として発見された。この突然変異体は他のBA突然変異体とは異なる表現型を有していた。突然変異体オリゴヌクレオチドBとともにこの領域に追加の突然変異体が産生された(BB突然変異体)。93位で保存されているジスルフィド結合を形成するシステインを妨害するとまったく予測できない好ましくない影響を示すため、領域4の突然変異はさらなる解析により除去された。さらに数個の突然変異体は、2つ以上の領域(BR-474、BA-72)を含有するか、高度に劣化したトキシシン(BR-267)を産生するか、または既に存在する突然変異体(BA-50)と同じであるため、さらに性状解析はしなかった。

実施例4 組換えSEBの調製

最初のスクリーニングのために、寒天プレートから採取した形質転換体の個々のコロニーを、100 μ lの2XVTとカルベニシリン(carbenicillin)を含有する96ウェルのマイクロタイタープレートに移した。BAはウ

ェルとして1mMのIPTGを含有する以外は、同じプレートを調製した。いずれも攪拌しながら37℃で一晩インキュベートした。最初のプレート各ウェルに50 μ lのグリセロールを加え、これを混合し、次に-70℃で保存した。SEB含有溶解液を調製するために、2番目のプレートの各ウェルに、3mg/mlのリゾチームと300 μ g/mlのDNase Iを含有する50 μ lのHNM緩

衝液（10 mMのヘペス、pH 7.0、30 mMのNaCl、5 mMの塩化マグネシウム）を加えた。このプレートを37℃で15分間インキュベートし、3回凍結融解し、遠心分離してペレット破片にした。上澄液を新しいプレートに移し、ELISAおよびT細胞ハイブリドーマ刺激の両方によりSEBの存在を調べた。この方法で0.3 µg/mlと10 µg/mlのSEBを含有する調製物が産生された。

精製した突然変異体SEBを産生するために、-70℃で保存した96ウェルのマイクロタイタープレートから形質転換体を回収した。IPTGを含有する一晚培養物（1容量）からの細菌を遠心分離により集め、1-2 mg/mlのリゾチームと10 µg/mlのDNase Iを含有する1:10容量のHNM緩衝液中に再懸濁した。懸濁液を15,000 gで20分間遠心分離して細菌の破片を除去し、上澄液を集めてろ過した（0.2 µm）。2-3 mg/mlのモノクローナル抗体でSEB（B344）に結合した1:50容量のファロース4Bビーズを含有するカラムに濾液を通した。ビーズをPBSで完全に洗浄し、トキシンを0.1 Mのグリシン-HCl（pH 2.7）で溶出し、1 Mの炭酸ナトリウムで中和した。SEBを1 mg/mlに濃縮し、セントリコン10マイクロコンセンレーター（Centricon 10 microconcentrators）（アミコン社（Amicon Corp.）、デンバーズ（Denver）、マサチューセッツ州）を用いて緩衝液をBSSに変更した。この方法で細菌培養物1リットルにつき3-10 mgのトキシンが得られた。こうして産生したSEBとその突然変異体はSDS-PAGEによると95%以上の純度があった。領域1のSEB突然変異体を表2に示し、領域1突然変異体と領域2突然変異体を表3に示し、領域3突然変異体を表4に示す。

記載した突然変異体はすべてAからG、またはTからCのヌクレオチド置換を含有し、これはこれらの産生のために用いた方法から予測されるであろう。

オリゴヌクレオチドCまたはAを用いて突然変異が産生される時、これらの突然変異はSEB配列のアミノ酸9-23（領域1）、または41-53（領域2）に濃縮された（表3）。

オリゴヌクレオチドプライマーBを使用した時、表4に示した突然変異体が産生された。

正常のSEBではアミノ酸93はシステインである。このために、この領域の突然変異はジスルフィド結合を妨害する可能性があるため、さらに考慮しなかった。すなわち突然変異体BR-30とBR-311を排除した。

トキシンが非常に劣化しているため、2カ所以上の領域で変化がある突然変異体（2個以上の突然変異体ではない）（すなわちBR-474とBA-72）もまたBR-267のように除いた。BA-50は公知の突然変異体であり、これ以上検討しなかった。

SEBの構造研究

おそらく最も研究されたスタフィロコッカスのエンテロトキシンである、SEBの3次元構造は最近報告された（スワミナサン（Swaminathan）ら（1992）Nature 359:801）。SEBの模式図を図1に示す。SEB分子は2つのドメインを含有する。最初のドメインは残基1-120よりなり、2番目は残基127-239よりなる。前述したように、MHCクラスII結合および／またはT細胞活性化に影響を与えるSEBのN-末端部分に3つの領域が同定されている（カプラー（Kappler）ら（1992）J. Exp. Med. 175:387）。これらの各領域に、関与する特異的アミノ酸が測定されている。同定された残基のあるものはMHCクラスII結合とT細胞活性化に影響を与え、他はT細胞活性化のみに影響を与える。スーパー抗原MHCクラスII結合はT細胞に必須であるため、MHCクラスII結合に影響を与える残基はT細胞活性化に影響を与えるため、これらからT細胞結合情報は得られない。しかしこれらはスーパー抗原上のMHCクラスII結合部位に関する情報を与える。一方、T細胞活性化に影響を与えるがMHCクラスII結合に影響を与えない残基は、SEB上のT細胞結合部位中にある可能性がある。

9-23のアミノ酸残基として定義される領域1は、TCR結合とMHCクラスII結合の両方に影響を与えるため、二機能性である。この領域の突然変異には、10、14、17および23位の残基を、単一または2つの突然変異として含

んでいた(表2)。残基23(N23)のアスパラギンは α -らせん(α 2)の上であり、側鎖は溶媒の方を向いている。これは最も重要な残基であり、すべてのスタフィロコッカスのエンテロトキシンで保存されておりTCR活性化に最も重要である。MHCクラスII結合を妨害したものは23位のわずか5つの突然変異体であるが、すべてのものがTCR活性化に影響を与えた。残基14と17の突然変異はMHCクラスII結合とTCR活性化の両方に影響を与えた。残基S14は非常に短い α -らせん(α 1)であり、溶媒に暴露されているがF17は α 1のもう一方の端に位置している。トキシンの表面のS14、F17およびN23(図1)の位置は、MHCクラスII分子および/またはV β と最も重要な接触をするのに好ましい。残基F17は内部を向いており、残基174-179と203-209の2つの別のループに挟まれたループ中に存在する。これはセリン(F17S)による置換は、MHCクラスII結合とサイトカイン産生を低下させる構造変化を導入したかも知れないことを示唆している。S14(α 1上)とMHCクラスII結合、そしてN23(α 2上)とTCR活性との関連は、領域1の二機能性の役割のもととなる構造的基礎を表している。この領域は小数の連続的なアミノ酸よりなるが、異なる機能に関与している第2の構造の別の隣接している成分上に分散されている。 α 1と α 2が近接していることは、領域1のアミノ酸はV β とMHCクラスIIの結合部の近くの3分子複合体中に位置しているという提案(カプラー(Kappler)ら(1992)前述)と一致している。

領域2は残基40-53と定義され、すべてのスタフィロコッカスのエンテロトキシンにおいてMHCクラスIIへの結合を仲介するのに重要であると示唆されている。この領域の突然変異の約半分は、保存残基F44(表3)を含有していた。他の突然変異には残基41、45、48、52および53を含有していた。すなわちこの領域はおそらく、MHCクラスII結合に特異的である。残基48-52は β 鎖(β 2)中にある。残基F44は β 1と β 2を連結する曲がり角の上であり、側鎖が溶媒に露出している。これはMHCクラスIIと重要な疎水性結合接触をするのに好都合に位置している。

領域3は2つの残基(60と61)で構成されており、このいずれかの突然変

異はTCR活性化に影響を与えるがMHCクラスII結合には影響は与えない。残基60と61は $\beta 2$ と $\beta 3$ を連結するループ内にある、溶媒に露出されている(表4)。

実施例5 突然異SEBのHLA-DRへの結合

MHCクラスIIへの結合はT細胞によりトキシン認識に必須であるため、突然変異はトキシンのDR分子への結合能力またはTCR- α/β によるこの複合体の認識能力に影響を与えたかも知れない。これらの2つの可能性を区別するのを助けるために、HLA-DR1ホモ接合リンパ芽腫株LG2を用いた(Gatti and Leihold) (1979) Tissue Antigens 13:35)。¹²⁵I-標識LG2細胞を、50 μ g/mlの組換えSEBを加えてまたは加えないで37℃で2時間インキュベートした。細胞を含まない溶解液を1%ジギトニン中で調製し、3mg/mlのB344抗SEBモノクローナル抗体の結合したセファロースビーズと、室温で4時間インキュベートした。ビーズを完全に洗浄し、標識した結合した物質を還元下のSDS-PAGE(リームリ(Laemmli) (1970) Nature 227:680)とオートラジオグラフィーで解析した。対照として、抗DRモノクローナル抗体のL243(ランプソンとレビー(Lampson and Levy) (1980) J. Immunol. 125:293)を使用した(溶解液の1/20容量を抗SEBビーズとともに使用した)。

SEBはLG2上でDR分子に結合する(図2b)。免疫親和性精製したトキシンを調製し、SEBとその突然変異体を精製するのに使用したのと同じ抗SEBモノクローナル抗体を用いるフローサイトメトリーにより、そのLG2への結合能力を評価した。100 μ lの組織培養培地中で 3×10^4 個のLG2細胞を37℃で一晩インキュベートした。細胞を完全に洗浄し、約1 μ g/mlの抗SEBモノクローナル抗体(B344.1)とともに4℃で30分間インキュベートした。細胞を再度洗浄し、蛍光標識したヤギ抗マウスIgG1(フィッシャーサイエンティフィック社(Fisher Scientific Co.))と

ともに4℃で15分間インキュベートした。細胞を再度洗浄し、細胞の表面蛍光

を解析し、第2の試薬のみに対して添加したトキシンの量で見られた蛍光について補正した。その結果（表4に示す）は、領域1、2および3のそれぞれの突然変異について示されている。

4つの領域1の突然変異体によりLG2への結合は、突然変異していないSEBのそれと区別することができなかった。他の3つの突然変異体は結合能力が約100倍低下していた。これらの結果は、領域1内の残基14と23の間の残基はMHC結合に重要であることを示唆している。7つの突然変異のうちの5つは23Nが関与していた。1つの場合（BR-29、23N→S）でのみこの突然変異がMHC結合を低下させた。これらの結果は残基23NはNHC結合とVβ相互作用に重要であることを示唆している。領域2の突然変異はすべてほんのわずかにLG2に結合し（SEBより約1,000倍弱い）、領域2の突然変異体はトキシンのクラスIIMHCへの結合に重要なアミノ酸の範囲（特に44F）を規定していることを示している。領域3の突然変異体はLG2への結合に基本的に影響されず、この2アミノ酸領域（60N、61Y）はVβ相互作用に重要であることを示唆している。

実施例5 異なるVβ成分を有するT細胞上の突然変異の影響

SEB突然変異体はもともとVβ7*またはVβ8.3*T細胞ハイブリドーマを刺激するため同定された。T細胞認識上のSEB突然変異体の影響をさらに詳細に評価するために、精製した突然変異体トキシンを種々の投与量で、SEBを認識することが知られている4つの齧歯類のVβ成分（Vβ7、Vβ8.1-3（ホワイト（White）ら（1991）前述；キャラハン（Callahan）ら（1989）前述；ハーマン（Herman）ら（1991）前述））のそれぞれを有する追加のT細胞ハイブリドーマに対して試験した。異なる濃度のトキシンを、200μlの組織培養培地中の3×10⁴個のDR⁺細胞とともに37℃で一晩インキュベートした。必須のVβ特異性を有する5×10⁴個のT細胞ハイブリドーマを50μlで加え、混合物を一晩インキュベートした。カプラー（Kappeler）ら（1981）J. Exp. Med. 153:1198とモスマン（Mosmann）（1983）J. Immunol. Meth.

65:55に従い、T細胞ハイブリドーマの応答を分泌されるIL-2として測定した。結果を図5-7に示す。

領域1の突然変異体(図5)のうち、23Nを有する5つ(BR-257、BR-291、BC-6、BC-66、BC-88)は、これらの4つはSEBと同様にDRに結合したにもかかわらず、すべてのハイブリドーマをほんのわずかに刺激したのみである。これらの結果は、残基23NはV β 相互作用に重要なアミノ酸であるが、このアミノ酸を含む5番目の突然変異体(BR-291)はMHCにわずかに結合したのみであるため、このアミノ酸はMHC結合にも影響を与えるかも知れないことを示している。他の2つの領域1の突然変異体もまたわずかに刺激したのみである。BR-75の場合これは主にその弱いDRへの結合のためかも知れないが、BR-210突然変異の影響はDRへの結合よりもT細胞刺激に対して数オーダー大きかった。これらを総合すると、これらの結果は、DRに結合したSEBのT細胞認識の間領域1のアミノ酸は、V β とMHCの間の結合部の3分子複合体中に位置しており、各残基は各成分と相互作用することの証拠である。

他の領域の突然変異はそれほど複雑でない表現型を産生した。領域2の突然変異体のすべては、それらのリセプター中にV β 成分があるにもかかわらず(図6)、T細胞ハイブリドーマのすべてを刺激することはなかった。小さな差はあったが、一般に刺激に対する突然変異の影響はDR結合で見られたものと同じであった。これらの結果は、領域2の突然変異は主にDR結合に影響するという結論に一致する。

2アミノ酸の領域3の突然変異体は最も差があった(図7)。この領域に隣接する20アミノ酸の範囲中のランダム突然変異体が、これら2つのアミノ酸中に見いだされた。これらの突然変異体は、V β 7を有するハイブリドーマを刺激しなかったが、V β 8.2またはV β 8.3を有するハイブリドーマを刺激した。この性質はこれらのハイブリドーマの特異的ではないことを確認するために、トキシンを4つの他のT細胞ハイブリドーマ(1つのV β 7⁺、2つのV β 8.1⁺および1つのV β 8.3⁺)で試験した。結果は図7のものと区別することができなかった(データは示していない)。

実施例6 SEBのインビボ作用のためのT細胞相互作用の必要性

細菌トキシンのスーパー抗原性がそれらのインビボの毒性にいかに重要であるかという問題は、解決していない。本発明者らによる以前の実験は、SEBの毒性は関連するV β 成分を有するT細胞の頻度に直接関連しているため、マウスにおけるSEBの毒性は、V β 特異的にT細胞を刺激する能力に関連していることを示唆していた（マラック（Marrack）ら（1990） J. Exp. Med. 171:455）。しかしいくつかのS. aureusのトキシンが単球上のクラスIIに結合、TNFやIL-1のようなサイトカインの産生を刺激する能力（パルソネット（Parsonnet）（1988） Rev. Infect. Dis. 1:263）は、直接の単球刺激はある状態におけるトキシンの病原性の多くを説明するのに充分であるかも知れないという可能性を開く。

この考えを試験するために、クラスIIMHCには充分結合するが、極度な高濃度以外ではT細胞を刺激しない、領域1の突然変異体BR-257を種々の濃度でマウスに注射した。突然変異していないSEBと突然変異体BR-358（これらは領域2のすべての突然変異体のようにクラスIIMHCにはわずかに結合するのみである）を対照として使用した。調製物を汚染するかも知れないLPSの影響を最小にするために、LPS応答性の欠如した株であるC3H/HeJマウスを使用した。急速な体重減少がマウスにおけるSEBの最も顕著で急速な毒性であるため（マラック（Marrack）ら（1990）前述）、0日に注射をした後マウスの体重を毎日測定した。

3匹のマウスの群の体重を測定し、0 μ g、50 μ gまたは100 μ gの組換えSEB、突然変異体SEBBR-257、または突然変異体SEBBR-358を含有するバランスト塩水溶液（BSS）を与えた。マウスが死ぬまで毎日体重を測定した。結果を図8に示す。結果は生存しているマウスの開始体重からの変化の平均割合で示してある。

50 μ gまたは100 μ gの組換えSEBを与えたマウスは、3-4日間で急速に体重が減少し、すべてのマウスは5日以内に死んだ。突然変異体BR-358を与えたマウスは影響を受けず、BSSのみを与えたマウスと区別がつかなかった。しかし100 μ gのBR-257を与えられたマウスはわずかな体重減少

を示し、後に回復した。

これらの結果は、マウスではSEBの毒性の大部分はそのT細胞を刺激する能力に依存していることを確認しており、これはT細胞誘導性リンホカイン自身またはT細胞により活性化される他の細胞により産生されるものは、このトキシンの作用様式に非常に重要であることを示唆している。しかし、高投与量におけるBR-257のわずかな作用は、T細胞の関与なしで結合したSEBにより直接刺激されたクラスIIを有する細胞からの寄与の可能性を示す。

実施例7 SEB突然変異体の防御効果

SEB突然変異体の防御効果を試験した。これらの実験において、野生型のSEBで抗原刺激する前に生理食塩水または100 μ gのBR-257をマウスに投与した。投与の日（「0」日）に50 μ gのSEBを腹腔内投与した。体重の変化と生存を測定した。結果は図9に示す。

対照を与えたマウスは、SEBにより抗原刺激の後4-5日後に死に、SEB突然変異体で免疫したマウスでは防御効果が見られた。

実施例8 SEB突然変異体の産生と動物におけるその防御作用

スタフィロコッカスのエンテロトキシンA（SEA）突然変異体を、前述の方法に従って産生した。SEAのアミノ酸配列にSEBのアミノ酸配列を重ね合わせると、45位の突然変異は45位のSEB突然変異体で見られるのと同様にSEAがMHCに結合する能力を阻害することが見いだされた。

霊長類で同様の試験を行った。野生型SEB、領域I SEB突然変異体BR-257（F44で突然変異）またはBR-358（N23で突然変異）の1つをマウスに投与し、嘔吐性応答の誘発を評価した。いずれのSEB突然変異体も、霊長類において効果がないか、野生型SEBよりも効果ははるかに小さかった。

これらの結果は、本明細書中に記載された突然変異体スーパー抗原の産生方法は、一般的にすべてのスーパー抗原に適用可能であり、患者をスーパー抗原の病原作用から防御する方法を与えることを、確認している。

表 1 既知のスーパー抗原配列と構造

スタフィロコッカス	スタフィロコッカス エンテロトキシンA	Huang et al (1987) J. Biol. Chem. <u>262</u> :7006 Betley et al. (1988) J. Bacteriol. <u>170</u> :34
	スタフィロコッカス エンテロトキシンB	Jones & Khan (1986) J. Bacteriol. <u>166</u> :29 Huang & Bergdoll (1970) J. Biol. Chem. <u>245</u> :3518 Ranelli et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. <u>82</u> :5850
	スタフィロコッカス エンテロトキシンC1及びC3	Schmidt & Spero (1983) J. Biol. Chem. <u>258</u> :6300 Bohach & Schlievert (1987) Mol. Gen. Genet. <u>202</u> :15 Couch & Betley (1989) J. Bacteriol. <u>171</u> :4507
	スタフィロコッカス エンテロトキシンD	Bayles & Iandolo (1989) J. Bacteriol. <u>171</u> :4799
	スタフィロコッカス エンテロトキシンE	Couch et al. (1989) J. Bacteriol. <u>170</u> :2954
毒性ショックトキシン		Schlievert et al. (1981) J. Infect. Dis. <u>143</u> :509 Blomster-Hautamaa et al. (1986) J. Biol. Chem. <u>261</u> :15783 Bergdoll et al. (1981) Lancet <u>1</u> :1017
剥離性トキシン		Lee et al. (1987) J. Bacteriol. <u>169</u> :3904
ストレプトコッカス	ストレプトコッカス ピロゲニクトキシンC	Goshorn & Schlievert (1988) Infect. Immun. <u>56</u> :2518 Tomai et al. (1990) J. Exp. Med. <u>172</u> :359
マウス乳癌ウイルス		Fasel et al. (1982) EMBO J. <u>1</u> :3 Donehower et al. (1981) J. Virol. <u>37</u> :226 Donehower et al. (1983) J. Virol. <u>45</u> :941 Racaviskis & Prakash (1984) J. Virol. <u>51</u> :604 Choi et al. (1991) Nature <u>350</u> :203 Acha-Orbea et al. (1991) Nature <u>350</u> :207 Pullen et al. (1992) J. Exp. Med. <u>175</u> :41 Moore et al. (1987) J. of Virology <u>61</u> :480

表 2 領域1 S E B 突然変異体

変異体名	位置	変化
BR-75	F17	Phe-Ser
BR-210	S14	Ser-Leu
BR-257	10, N23	Asp-Asn; Asn-Asp
BR-291	N23	Asn-Ser
BR-358	F44	Phe-Ser
BR-374	D48, 160	Asp-Gly; Leu-Val
BR-30	Y91	Tyr-Cys
BR-311	C93	Cys-Arg
BR-474	46, C93	Tyr-Ser; Cys-Arg
BR-267	F44, 54, 55	Phe-Ser; Lys-Arg; Asp-Val

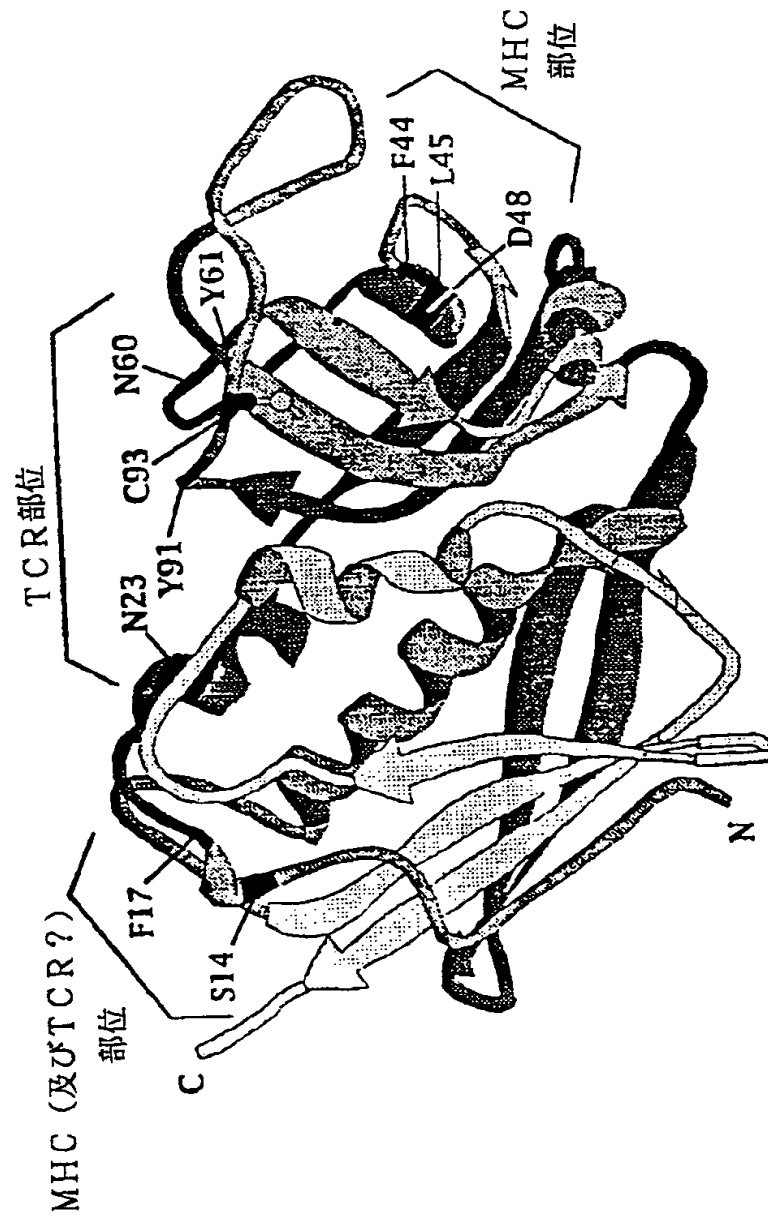
表 3 突然変異体オリゴヌクレオチドA又はCで産生させた領域1及び領域2 S E B 突然変異体

変異体名	位置	変化
BC-6	N23	Asn-Ile
BC-66	N23	Asn-Tyr
BC-88	N23	Asn-Lys
BA-3	F44	Phe-Cys
BA-15	L45	Leu-Val
BA-24	41, 53	Ile-Arg; Gln-Val
BA-31	46, 52	Tyr-Leu; Ser-Phe
BA-50	F44	Phe-Ser
BA-53	F44, 43	Phe-Leu; Ile-Arg
BA-62	Y61, 189	Gln-Ser; Ile-Arg
BA-72	L45, N60	Leu-Tyr; Asn-Lys

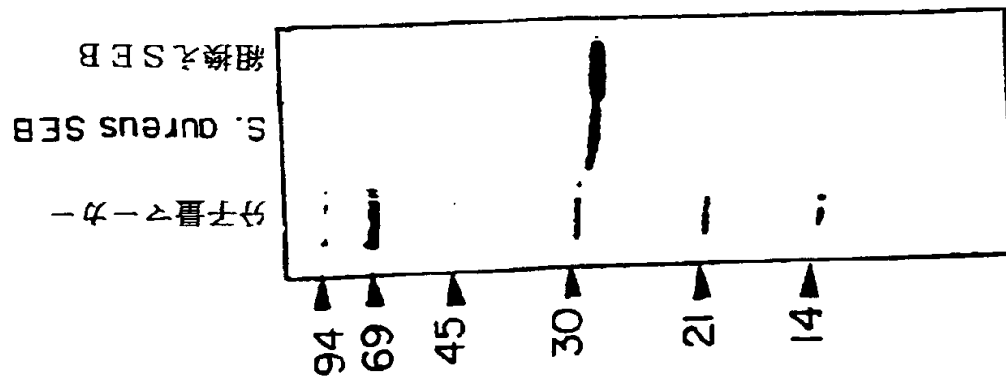
表 4 領域3 S E B 突然変異体

変異体名	位置	変化
BB-14	36, Y61	Gln-Leu; Tyr-Cys
BB-21	N60	Gln-Asn
BB-47	Y61	Tyr-Gln

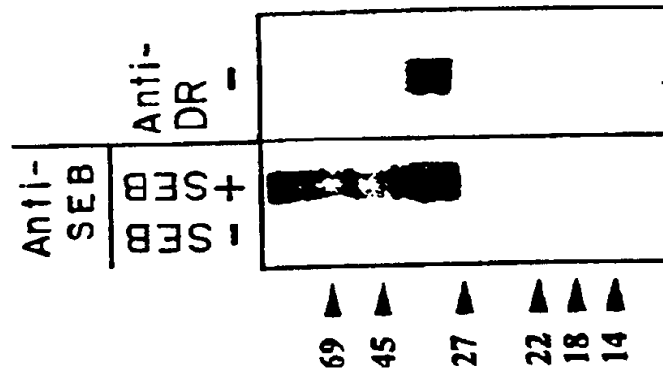
【图1】



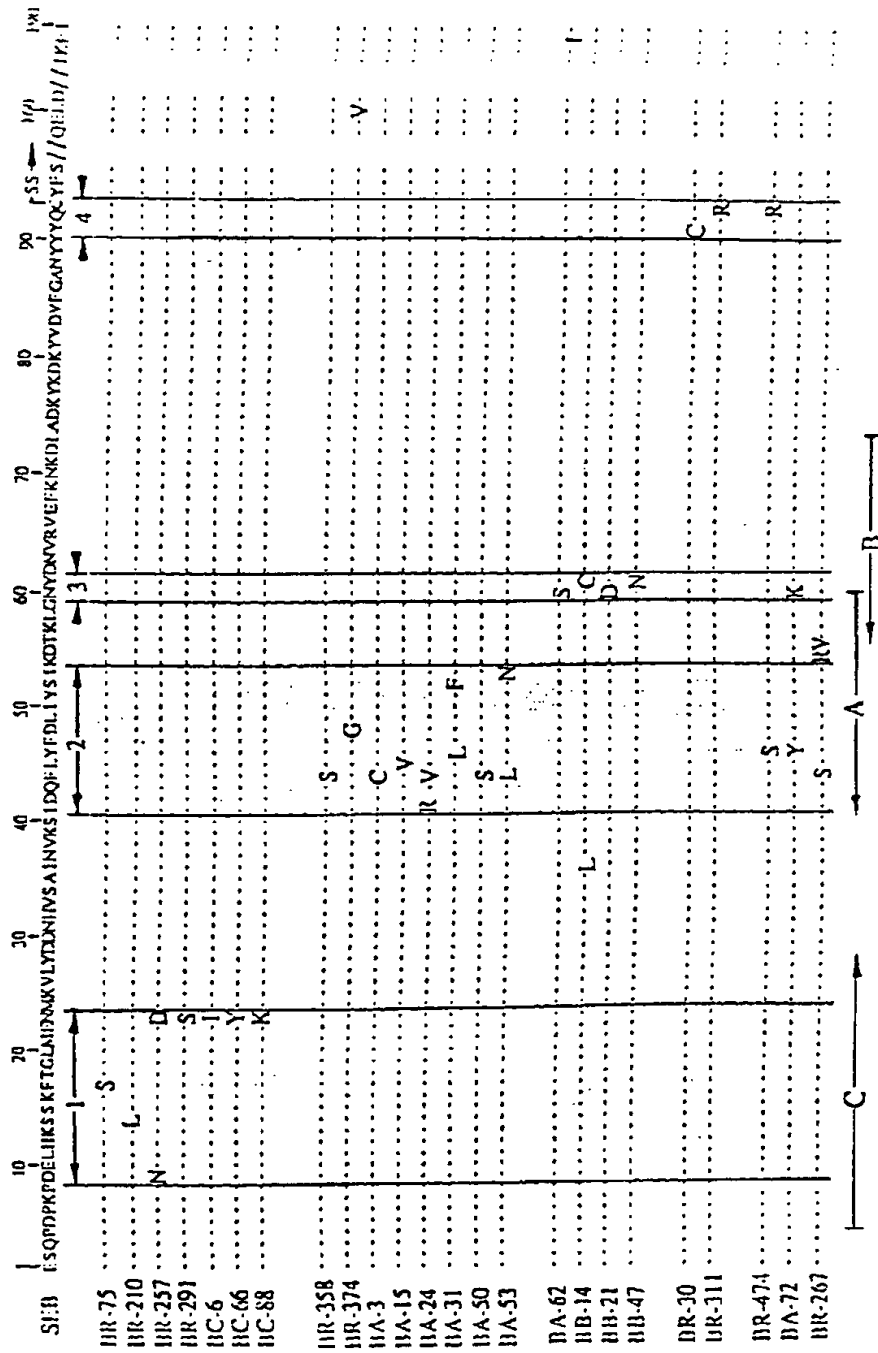
【図2A】



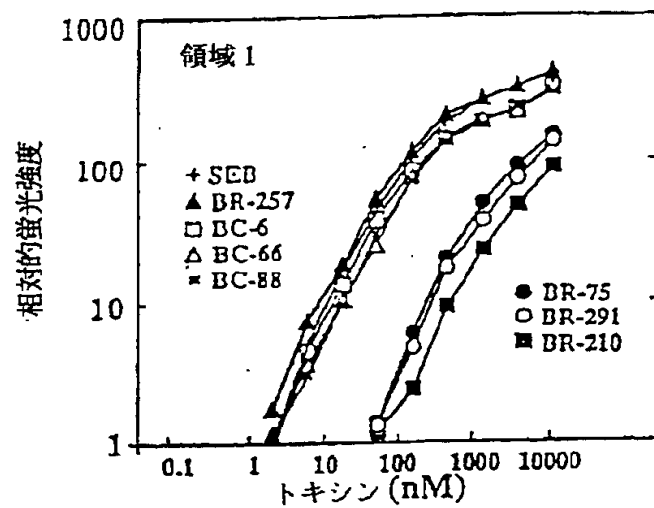
【図2B】



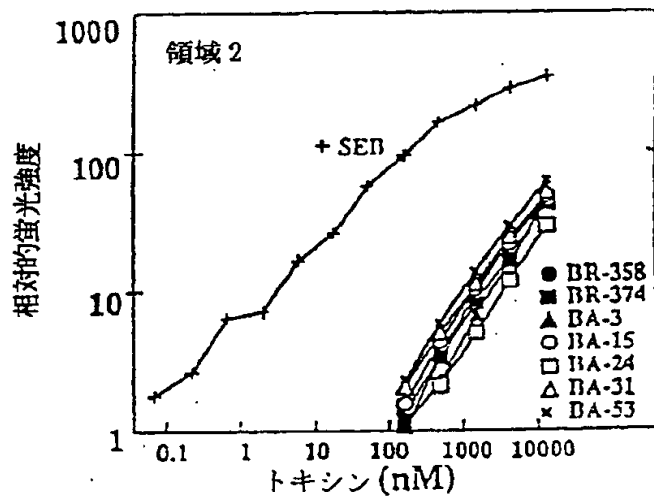
【図3】



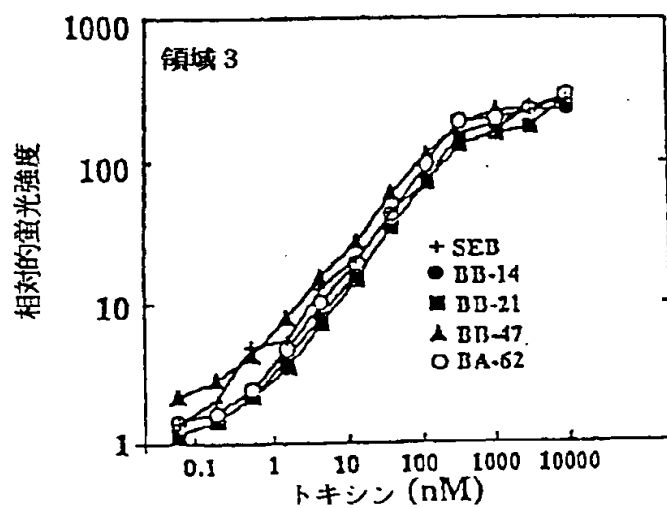
【図4A】



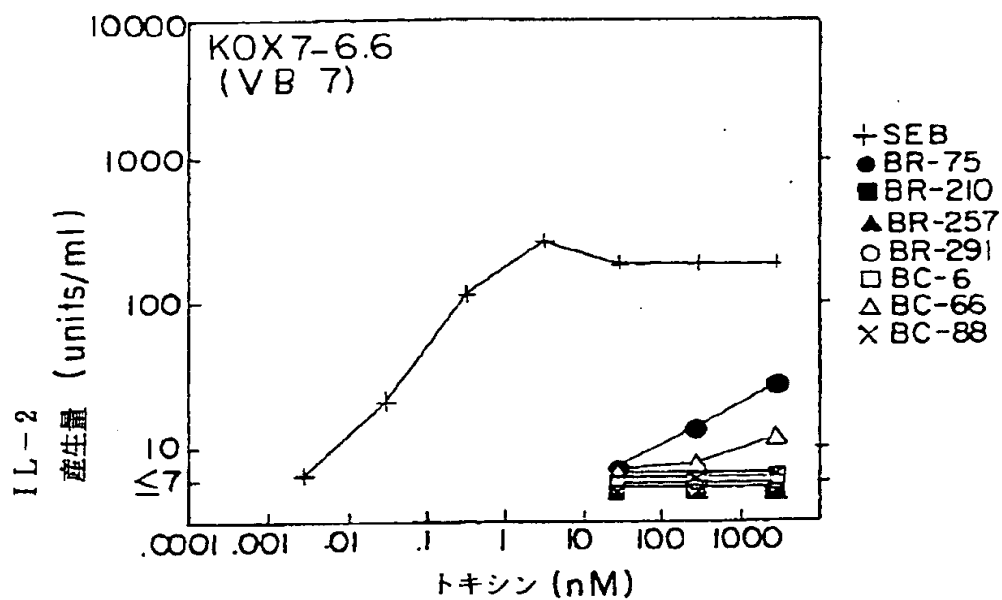
【図4B】



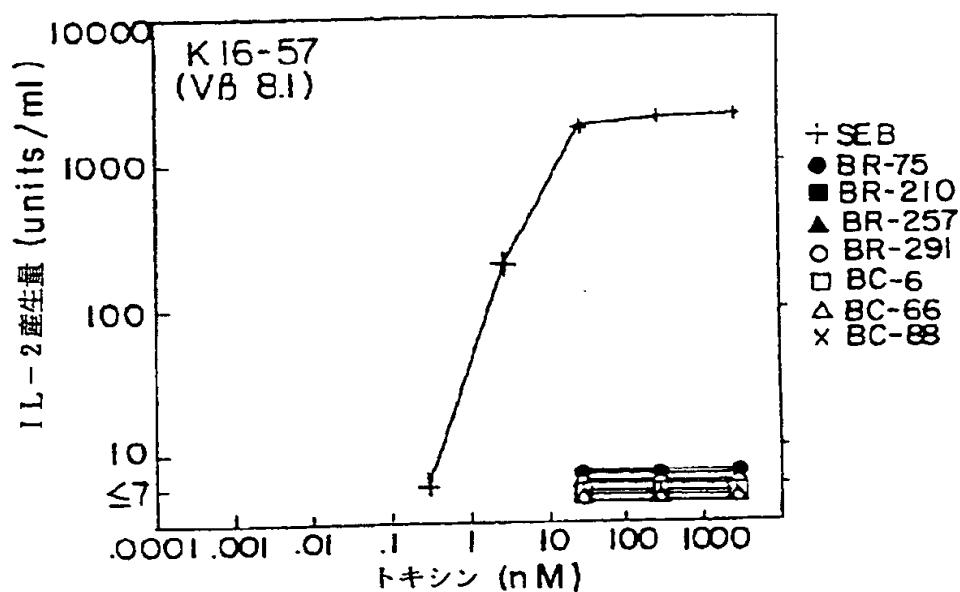
【図4C】



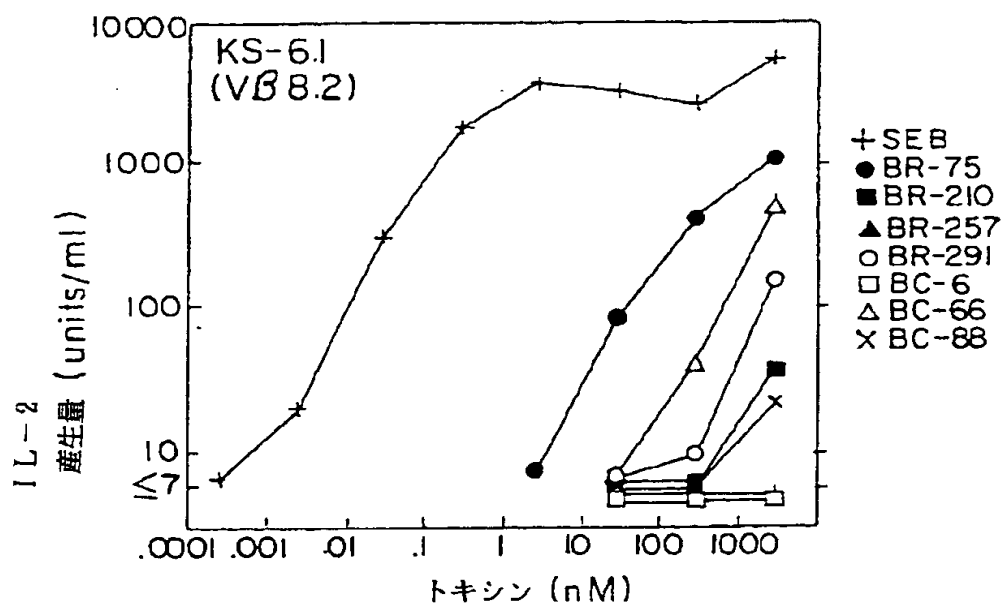
【図5A】



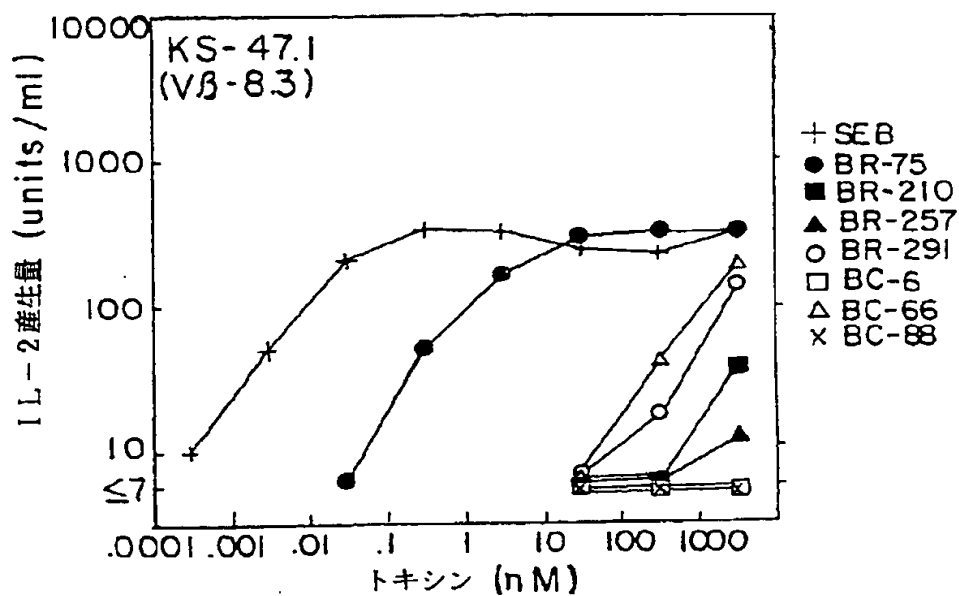
【図5B】



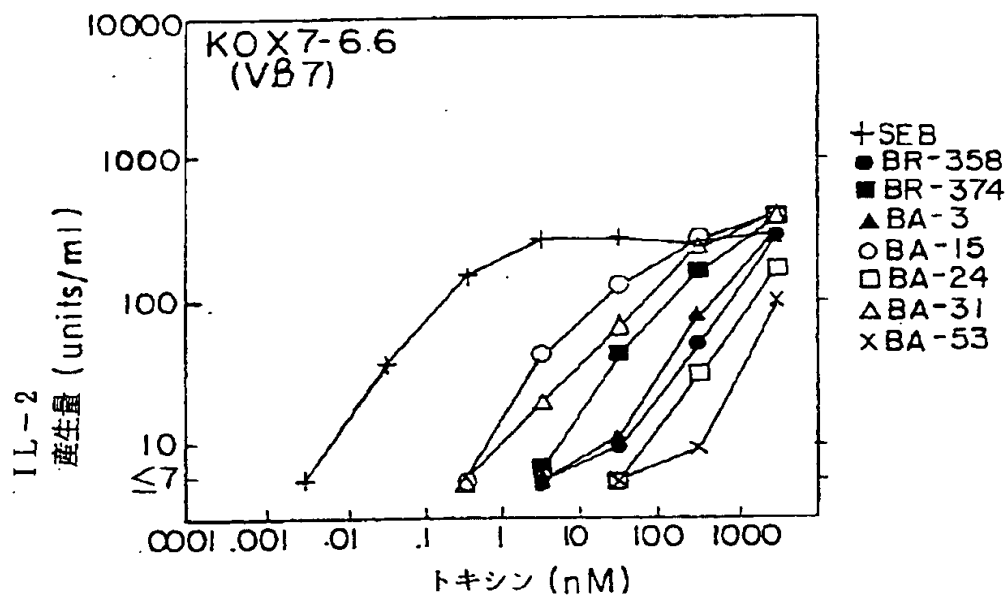
【図5C】



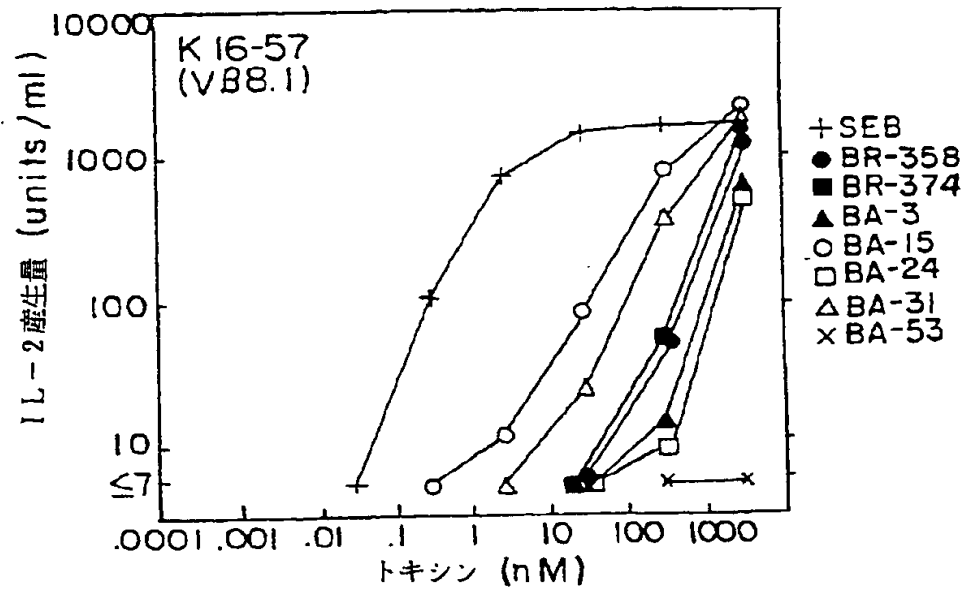
【図5D】



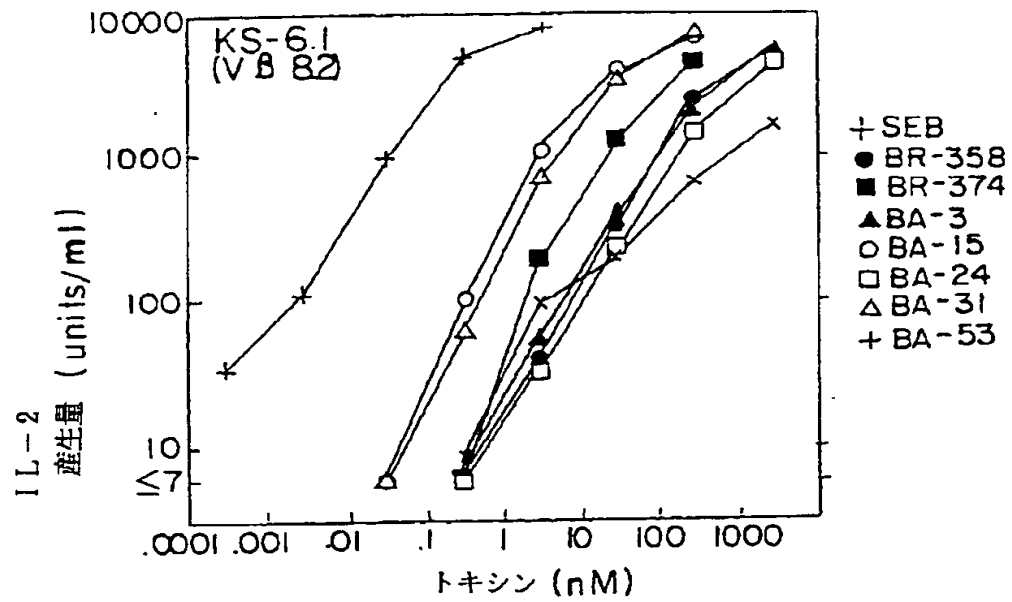
【図6A】



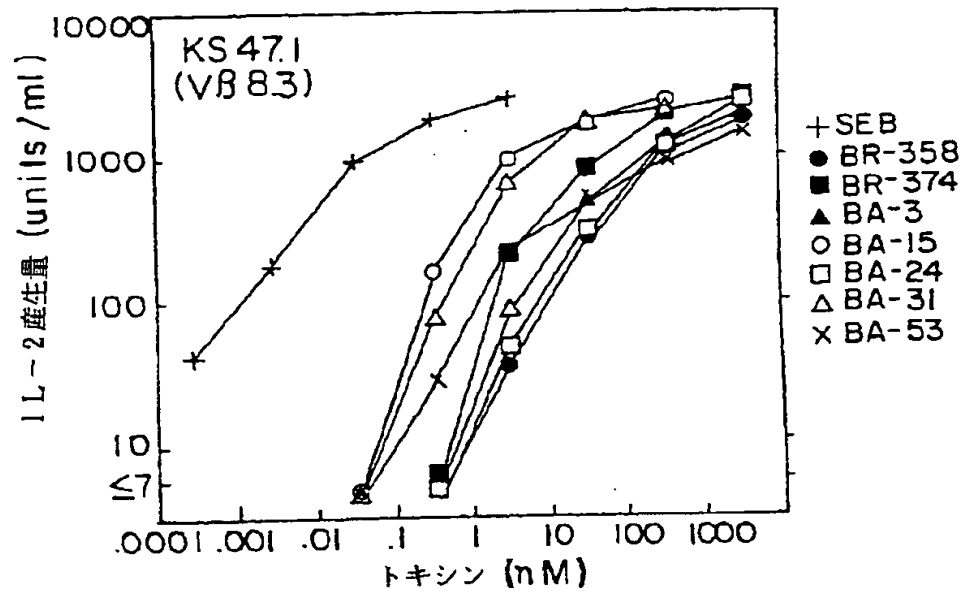
【図6B】



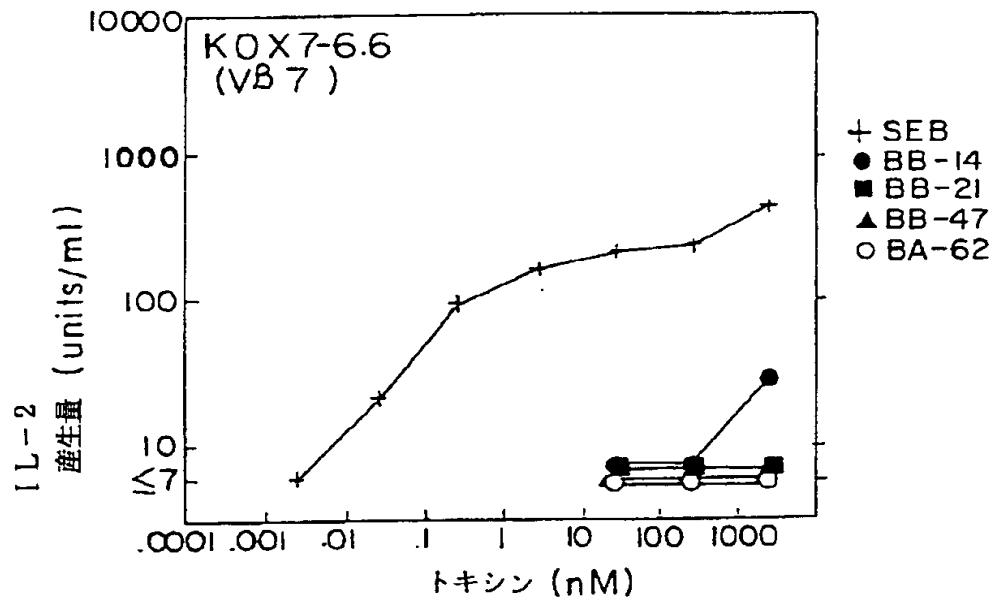
【図6C】



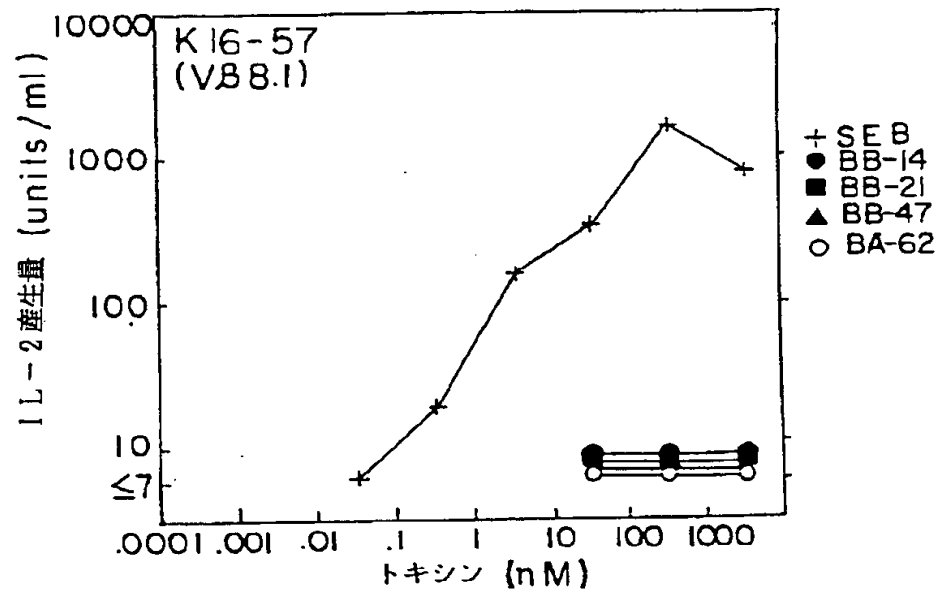
【図6D】



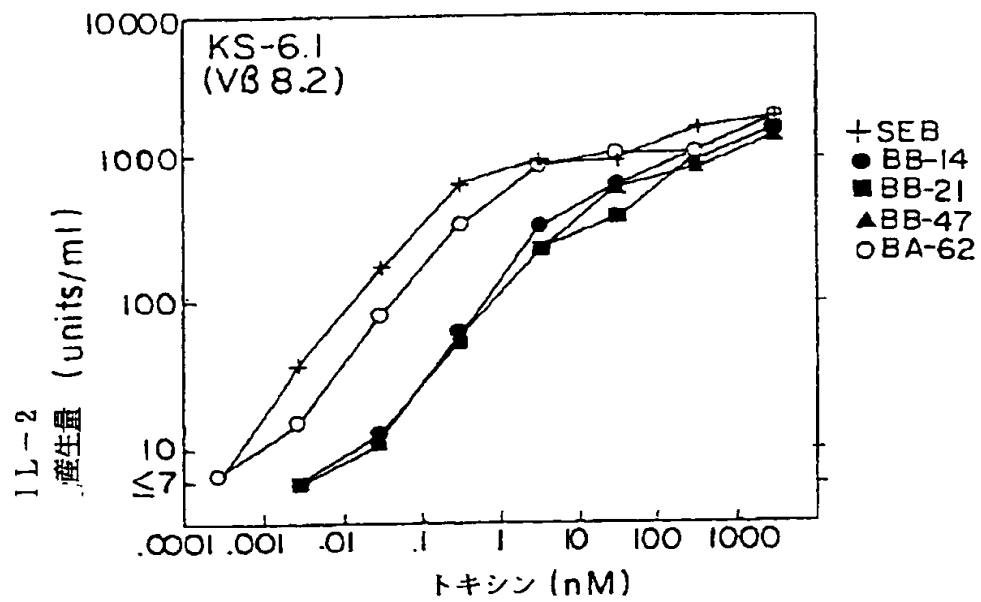
【図7A】



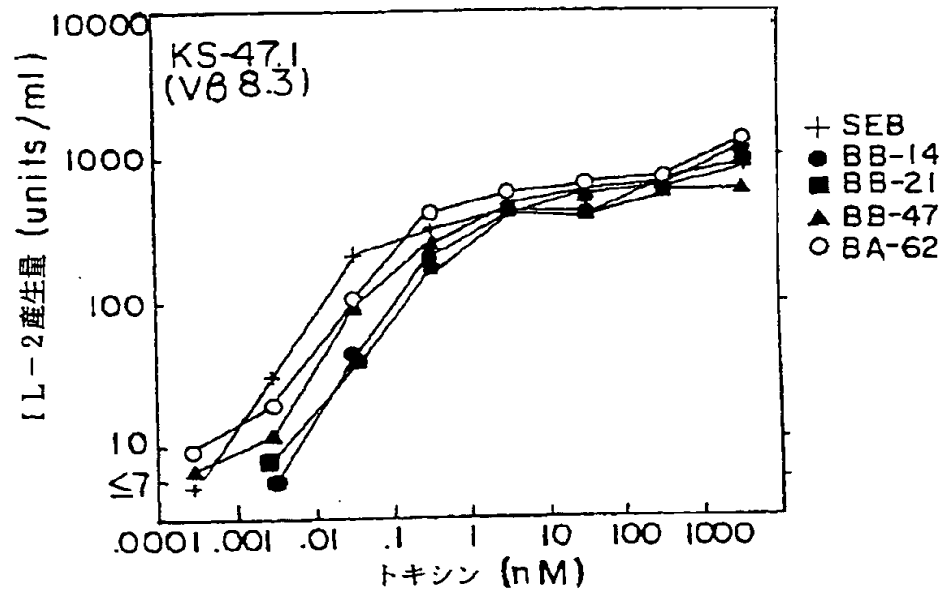
【図7B】



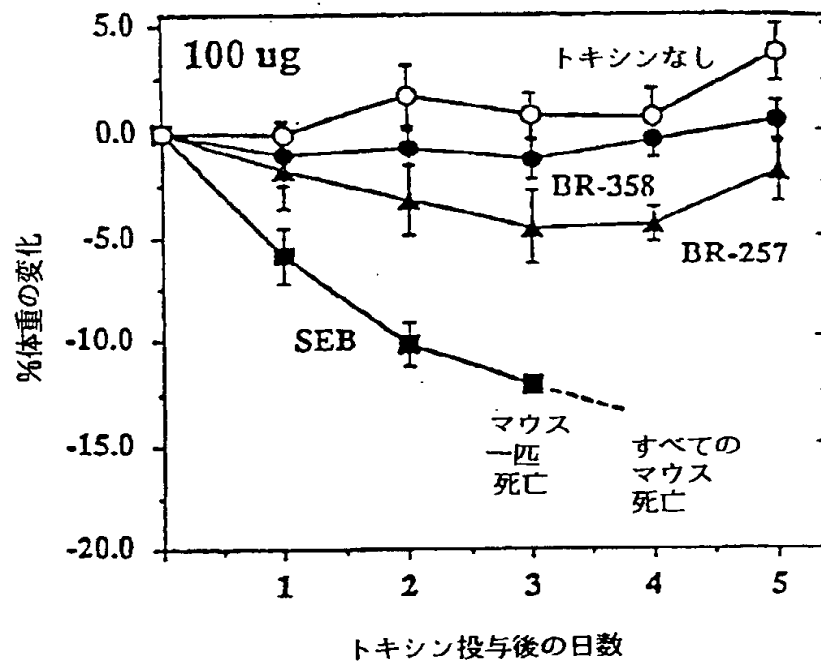
【図7C】



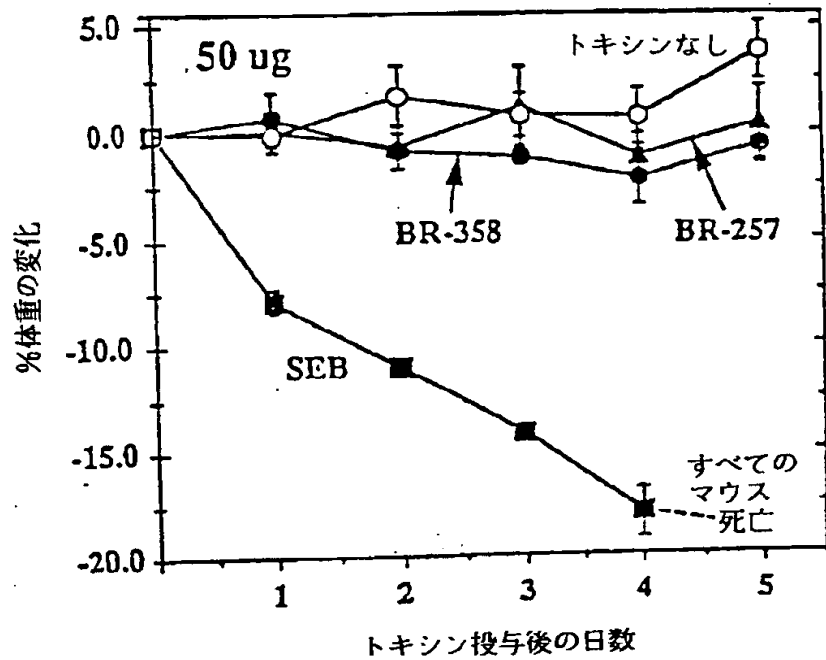
【図7D】



【図8A】

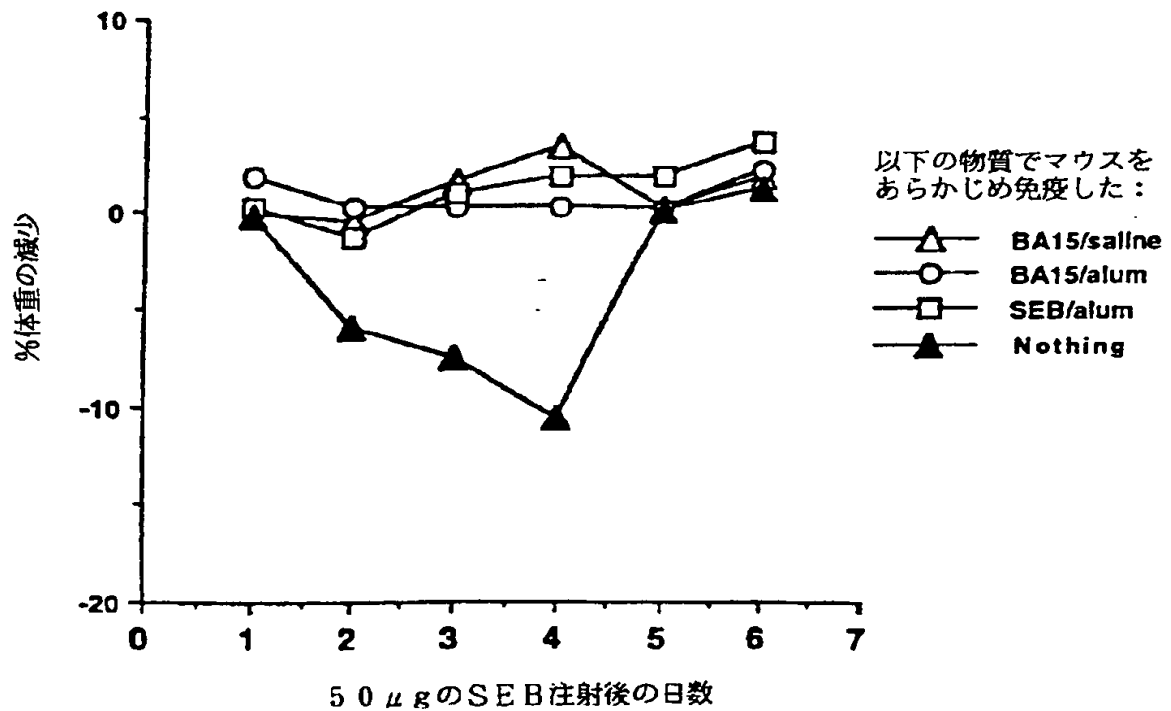


【図8B】



【図9】

突然変異トキシンはSEBによる
抗原投与に対し防御的である



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US93/00839

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(5) : Please See Extra Sheet.

US CL : Please See Extra Sheet.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 424/92; 435/7.1, 7.2, 7.33, 69.1, 69.3, 71.1, 172.3, 240.2, 320.1; 514/2; 530/350; 536/22.1, 23.1, 23.2, 23.4, 23.7

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

APS, BIOSIS

search terms: superantigen, SEB, staphylo?, vbeta, enterotoxin, enterotoxin b

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Jour. Exp. Med., Volume 171, issued February 1990, P. Marrack et al., "The Toxicity of Staphylococcal Enterotoxin B in Mice is Mediated by T Cells", pages 455-464., see entire document.	1-9
Y	D. M. Glover, "Gene Cloning", published 1984, by Chapman and Hall (N.Y.), see pages 20-47.	1-9
Y	Jour. Bact., Volume 166, No. 1, issued April 1986, C. L. Jones et al., "Nucleotide Sequence of the Enterotoxin B Gene from <u>Staphylococcus aureus</u> ", pages 29-33, see entire document.	1-9

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

A documents defining the general state of the art which is not considered to be part of particular relevance

E earlier document published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

A

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 April 1993

Date of mailing of the international search report

04 MAY 1993

Name and mailing address of the ISA/US
Commissioner of Patents and Trademarks
Box PCT
Washington, D.C. 20231

Facsimile No. NOT APPLICABLE

Authorized officer

ROBERT A. WAX

Telephone No. (703) 308-0196

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US93/00839

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:
IPC (5):

A01 N 37/18, A61K 37/00, 39/02; C07K 3/00, 13/00, 15/00, 17/00; C12N 5/00, 15/00; C12P 21/04, 21/06; C12Q 1/00;

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:
US CL :

424/92; 435/7.1, 7.2, 7.33, 69.1, 69.3, 320.1; 514/2; 530/350; 536/22.1, 23.1, 23.2, 23.4, 23.7

フロントページの続き

(51) Int. Cl. [°]	識別記号	庁内整理番号	F I
C 1 2 N 15/09	Z N A		
C 1 2 P 21/02		C 9282-4B	
(81) 指定国	EP (AT, BE, CH, DE,		
	DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M		
	C, NL, PT, SE), OA (BF, BJ, CF, CG		
	, CI, CM, GA, GN, ML, MR, SN, TD,		
	TG), AT, AU, BB, BG, BR, CA, CH,		
	DE, DK, ES, FI, GB, HU, JP, KP, K		
	R, LK, LU, MG, MN, MW, NL, NO, PL		
	, RO, RU, SD, SE, US		